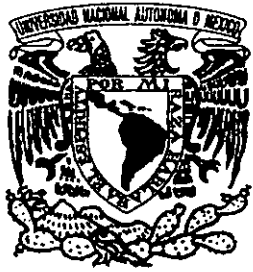


31



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA Y DEL GLUTATION REDUCIDO EN TRES MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON EN CUERPO ESTRIADO DE RATA

287463

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ALBERTO CAMACHO MORALES

ASESOR: DR. ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL

MEXICO. D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la

Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: **CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA Y DEL GLUTATION REDUCIDO EN TRES MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON EN CUERPO ESTRIADO DE RATA.**

realizado por *Alberto Camacho Morales*

con número de cuenta **9235313-0**, pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

✓ Propietario *Dr. Abel Santamaria Del Angel.*

✓ Propietario *P.M en C. Laura Osorio Rico.*

✓ Propietario *Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte.*

✓ Suplente Biol. *Julio Alejandro Prieto Sagredo.*

✓ Suplente *Dr. Ignacio Camacho Arroyo.*

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

La vida es algo que sólo algunas personas saben sentir, es un don, un sentimiento, un detalle, un deseo, el cuál solo dura un instante; y es ése preciso instante lo único que tenemos para darnos cuenta que ahí esta, para sentirlo y vivirlo hasta que dejemos de existir, pero a pesar de todo eso, la vida sigue siendo vida y es lo único que tenemos para ser feliz.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de ocupar el espacio que el mismo creó durante estos 24 años de mi vida; y mas aún por el haberme dotado del conocimiento necesario para lograr el término de esta tesis.

A mi director de tesis Dr. Abel Santamaría Del Angel, por su apoyo y dedicación a mi trabajo. A su esposa Sonia, y a su paciencia para adiestrarme en el conocimiento de la ciencia.

A Erika y Abi, por mostrarme el fascinante mundo de la ciencia, gracias a sus clases de conocimiento y comprensión.

A mis sinodales, por sus valiosos comentarios y correcciones en el desarrollo de esta tesis:
Dr. Abel Santamaría Del Angel
P.M en C. Laura Osorio Rico
Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo
Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

A mis padres por todo su apoyo, confianza y amor, durante tantos años.

A Laura Osorio Rico por su ayuda, su comprensión, su apoyo incondicional, sus sabios consejos y demás aptitudes que encierran a una gran mujer: mil gracias LOR.

Al Laboratorio de Neuroquímica y todos los que integran el mismo, por todos los detalles que en algún momento tuvieron hacia mí.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias y de la Preparatoria #8 por las tantas y tantas aventuras que pasamos juntos.

DEDICATORIAS

A Dios por ayudarme a ser humilde, a ser humano, a tener sentimientos y por darme la oportunidad de llegar hasta éste camino de mi vida.

A mis padres, por su apoyo durante tantos años, por creer en mí, por sus consejos, por su amor y por enseñarme a ver y vivir la vida como lo más importante que Dios nos dio.

A mi madre, por darme la vida, por darme su amor, por darme su amistad.

A mi padre, por su confianza, su sencillez y su actitud hacia la vida que tanto me ha ayudado.

A mis hermanos, Hugo y Manuel, por los buenos y malos momentos que hemos pasado, por nuestra hermandad y por ser una familia.

A toda mi familia y por su apoyo en todo momento.

A Laura por ser lo que fuiste en todo este tiempo, por tu ayuda y eterna paciencia, por ser la mujer con la que me he comprendido, por ser tú en toda la extensión de la palabra, por ti.

Abreviaturas.

- Enfermedad de Huntington	EH
- Enfermedad de Parkinson	EP
- Enfermedad de Alzheimer	EA
- Esclerosis lateral amiotrópica	ELA
- Acido quinolínico	QUIN
- Acido káinico	KA
- Acido 3-nitropropiónico	3-NPA
- Sistema nervioso central	SNC
- Glutación peroxidasa	GPx
- Glutación reducido	GSH
- N-metil-D-Aspartato	NMDA
- Dopamina	DA
- Acido γ -aminobutírico	GABA
- Succinato deshidrogenasa	SDH
- Radical superóxido	O ₂ ⁻
- Radical hidroxilo	OH [·]

INDICE

	Página
I. Resumen.....	2
II. Antecedentes.....	3
2.1. Enfermedades neurodegenerativas.....	3
2.2. Enfermedad de Huntington (EH).....	4
2.2.1. Genética de EH.....	5
2.2.2. Neuroquímica de EH.....	7
2.2.3. Neuropatología de EH.....	9
2.3. Modelos experimentales de EH.....	10
2.3.1. Acido quinolinico (QUIN).....	10
2.3.2. Acido kainico (KA).....	16
2.3.3. Acido 3-nitropropiónico (3-NPA).....	18
2.4. Tipos de receptores glutamatérgicos.....	23
2.5. Excitotoxicidad.....	24
2.5.1. Estrés oxidativo celular.....	26
2.5.2. Radicales libres y actividad endógena.....	28
2.5.3. Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	29
2.6. Sistemas de defensa antioxidante.....	31
2.6.1. Glutación reducido (GSH).....	34
2.6.2. Glutación peroxidasa (GPx).....	37
2.6.3. Glutación reductasa (GSSGred).....	38
2.7. Marcadores de estrés oxidativo.....	38
III. Hipótesis.....	40
IV. Objetivos.....	41
V. Procedimiento experimental.....	42
5.1. Animales.....	42
5.2. Reactivos.....	42
5.3. Métodos.....	43
5.3.1. Microinyección estereotáxica.....	43
5.3.2. Análisis de la actividad de GPx.....	44
5.3.3. Análisis del contenido de Glutación reducido (GSH).....	46
5.3.4. Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	48
5.3.5. Análisis estadístico.....	48
VI. Resultados.....	50
6.1. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN, KA y 3-NPA sobre la actividad de GPx.....	51
6.2. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN, KA y 3-NPA sobre el contenido de GSH.....	53
VII. Discusión.....	57
VIII. Conclusiones.....	62
IX. Referencias.....	63

I. RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es una neuropatía hereditaria autosómica dominante que se caracteriza por generar movimientos coreiformes involuntarios, déficit cognitivo y manifestaciones psiquiátricas severas, asociado todo con atrofia estriatal progresiva. El defecto genético de EH radica en un gen que lleva por nombre IT15, localizado en el brazo corto del cromosoma 4, y que consiste de una repetición larga de tripletes CAG del extremo 5' en la región codificante. Generalmente, los síntomas clínicos se desarrollan muy rápidamente después del inicio de la enfermedad y se componen de alteraciones motoras, trastornos psiquiátricos y debilitamiento cognitivo. La enfermedad se presenta frecuentemente en las personas entre los 30 y 50 años de edad. Existen diversos modelos experimentales capaces de reproducir las características histopatológicas y bioquímicas observadas en los pacientes con EH cuando se aplican a roedores y a primates no humanos. Entre éstos se encuentra la administración intraestriatal del ácido quinolinico (QUIN), el ácido kainico (KA) y el ácido 3-nitropropiónico (3-NPA). Aunque el sistema nervioso central (SNC) esta constituido de mecanismos de defensa antioxidante para hacer frente a los efectos de los radicales libres y otros productos oxidantes durante el metabolismo normal, cuando existe algún tipo de estrés oxidativo producido a través de vías endógenas o exógenas (tal como el generado por la administración de excitotoxinas), dicho sistema puede afectar a uno o varios de sus componentes. En este trabajo se practicaron inyecciones intraestriatales de cada una de estas toxinas a ratas para detectar posibles alteraciones en algunos índices de estrés oxidativo. Para ello, se midieron los cambios en la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx) y en los niveles estriatales de glutatión reducido (GSH) a 2, 3 y 6 horas después de las correspondientes lesiones. Se observó un aumento en la actividad de GPx, 3 horas después de la administración de 3NPA; así como disminución en los niveles de GSH 2 horas después de administrar QUIN y 6 horas después de la administración de 3-NPA comparado con valores control. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la administración tópica de excitotoxinas a ratas genera alteraciones en algunos marcadores de estrés oxidante que bien podrían representar ciertas condiciones patogénicas de EH. Así, la producción de radicales libres generados a partir de la sobre-excitación de los receptores glutamatérgicos, en especial de tipo NMDA, genera diversos mecanismos de daño celular que podrían ayudar a explicar los patrones de muerte celular apoptótica o necrótica observados en EH.

II. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades neurodegenerativas

La selectiva vulnerabilidad de los sistemas neuronales es una característica común en los trastornos degenerativos relacionados con la edad, tales como el mal de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la enfermedad de Alzheimer (EA) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (García y Massieu, 1992). Una reciente línea de investigación se ha dado a la tarea de indagar el posible papel del estrés oxidativo como la causa principal de este tipo de trastornos neurodegenerativos.

La EA fue descrita en 1906, cuando Alois Alzheimer, utilizó la técnica de impregnación argéntica para neurofibrillas descrita por Bielschowsky y observó las placas neuríticas o seniles (además de depósitos de proteína β -amiloide asociados a los vasos sanguíneos cerebrales extracelulares) así como las aglomeraciones de neurofibrillas que ahora caracterizan a la enfermedad que lleva su nombre. Alzheimer propuso que este caso representaba una enfermedad diferente a la demencia senil, dado su rápido desarrollo y temprana edad de iniciación. Las estructuras cerebrales que presentan con mayor frecuencia las alteraciones descritas son la neocorteza, algunas estructuras subcorticales como el hipocampo (Hayman y col., 1984), el cerebro anterior basal (Bondarref, 1986), la amígdala (Kemper, 1983) y algunas estructuras del tallo cerebral como el locus coeruleus (Bondarref, 1986). Desde el punto de vista neuroquímico, el cambio más importante en estos pacientes es la disminución en los niveles de acetilcolina (ACh), así como de la actividad de la colina-acetiltransferasa (CAT) (García y Massieu, 1992).

Por otra parte, en su obra "An assay on the shaking palsy", James Parkinson, describió virtualmente todas las características de la enfermedad que lleva hoy su nombre. Esencialmente Parkinson definió a la enfermedad como anomalías motoras persistentes caracterizadas por: temblor corporal en reposo, rigidez muscular, dificultad para iniciar movimientos y pérdida de los reflejos de la postura. Además de los síntomas motores, los pacientes afectados pueden presentar alteraciones conductuales y pérdida de las capacidades mentales, tornándose dependientes, temerosos, indecisos y pasivos. La EP puede definirse en términos bioquímicos como un estado deficiente en dopamina (DA), resultado de la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal, siendo que la severidad de los síntomas se relaciona con el grado de esta deficiencia (Hornykiewicz, 1982).

La ELA es un tipo de enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la muerte de neuronas motoras de la corteza cerebral y médula espinal. La enfermedad puede contraerse de dos maneras: familiar (genético 5-10%) y esporádica (que es la forma más común). Afecta a la mayoría de las inervaciones musculares como son la musculatura facial, extremidades inferiores, etc. La causa de la muerte neural es que existe una alta concentración de glutamato en el espacio extracelular, debido a que los sistemas de transporte del glutamato y acarreadores del mismo se encuentran afectados, por lo tanto, el glutamato ejerce un efecto tóxico en las células. Se ha descubierto que existe una mutación en la enzima superóxido dismutasa (SOD), que es la encargada de degradar a el radical superóxido (O_2^-) que se encuentra en el medio para evitar así la formación de radicales hidroxilo (OH \cdot), lo cual produce las características descritas anteriormente.

2.2. Enfermedad de Huntington (EH)

La EH fue reportada formalmente por primera vez en el año de 1872 por George Huntington, del Colegio de Medicina y Cirugía de la Universidad de Columbia, E.U.A., y fue descrita como un padecimiento hereditario asociado a la demencia y a alteraciones del movimiento (Huntington, 1872).

Se asigna generalmente el nombre de corea (del latín *chorea*, y éste del griego *choreia*: danza ritual o baile que solía acompañarse de canto) a ciertas afecciones en las que el síntoma principal es la aparición de movimientos involuntarios, rápidos, desordenados, irregulares, de gran amplitud y sin finalidad aparente, aunque tiene gran parecido a los movimientos voluntarios. Pueden afectar las más diversas regiones musculares (músculos faciales del lenguaje y de las extremidades) y se diferencia del temblor por su carácter irregular y su rápido desarrollo (Joynt, 1990).

La EH ha sido estudiada en detalle desde las últimas décadas del siglo pasado hasta nuestros días; es una enfermedad que se manifiesta principalmente en la vida adulta (Huntington, 1972). Los movimientos involuntarios coreiformes de las extremidades de la región facial representan las manifestaciones motoras de la corea. Con el progreso de la enfermedad, gradualmente se manifiestan características distónicas y parkinsonianas, así como trastornos motores que se extienden al tronco y a la orofaringe. Estas alteraciones conducen a la falta de coordinación progresiva, involuntaria, inseguridad, disartria, dificultades en la deglución de alimentos y disfagia (Shoulson, 1982). El control

oculomotor se ve afectado en las fases tempranas de la enfermedad y se caracteriza por movimientos sacádicos verticales y horizontales rápidos de los ojos; así como, anomalías en la fijación de los mismos que se van reduciendo con la evolución del mal (Leigh y col., 1983).

2.2.1. Genética de la EH

La EH es causada por la expansión, en un trinucleótido repetido no estable, de un gen con función desconocida. El locus de EH fue uno de los primeros loci asociados a la enfermedad en ser descubierto con la ayuda de fragmentos de restricción con gran polimorfismo; asimismo, el gen fue localizado en el cromosoma 4 y más específicamente en el sitio 4p 16.3 (Gusella y col., 1983). Después de 10 años de búsqueda, el gen para el transcrito 15 (IT15) fue finalmente identificado en 1993. Se estableció entonces que estaba constituido por trinucleótidos repetidos polimórficos que se expanden y son inestables. Los trinucleótidos repetidos contienen las bases citosina, adenina y guanina (CAG), codificando para el aminoácido glutamina. La secuencia repetida CAG se encuentra localizada dentro de la región codificante del codón 17, hacia la región 3' del codón de inicio ATG del exón 67 del gen. Este mismo es traducido y transcrito con el resto del gen; entonces comienza a originar un fragmento de poliglutamina en el producto del gen IT15, el cual es una proteína que se le ha asignado el nombre de huntingtina. En sujetos normales, el gen contiene aproximadamente de 9-34 repetidos de CAG, al darse la presencia de 37 o más repetidos CAG la enfermedad se hace presente (Ashizawa y col., 1994; Gusella y col., 1993). Sin embargo, algunas personas con 37-39 repetidos clínicamente no son afectados.

La huntingtina es una proteína de aproximadamente 3,140 aminoácidos, dependiendo del número de repetidos CAG, y con una masa aproximada de 349 kDa (Huntington's Disease Col. Res. Group, 1993). Hoogeveen y co-laboradores demostraron en 1993, que la huntingtina está localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas de los pacientes con EH. En contraste, en tejidos de órganos periféricos ésta sólo se localiza en el citoplasma. Difiglia y col., (1995), indicaron que en cerebros de humanos la huntingtina se encuentra presente en el citoplasma somato-neuronal, dendritas y axones. Más recientemente se ha demostrado que la huntingtina mutante sólo se localiza en pericarion neuronal y procesos nerviosos proximales, pero no en terminales nerviosas. Esto sugiere que existe una expresión anormal o procesamiento de la huntingtina mutante en

estos sitios.

De manera interesante, Diffligia (Diffligia y col., 1997) usando microscopia electrónica, demostraron que en pacientes con EH se encuentra un fragmento NH₂-terminal de la huntingtina mutante en inclusiones intracelulares y en neuritas distróficas. Estudios en clonas de homólogos IT15 en ratón y rata sugieren que el gen parece estar altamente conservado a lo largo de la evolución (Sharp y Ross, 1996). Este alto grado de conservación sugiere que la huntingtina puede tener un papel normal en las funciones celulares.

La herencia de la EH está claramente caracterizada por una anticipación genética. Este tipo de anticipación al parecer, proviene a partir de la vía paterna, lo cual indica un gran número de divisiones mitóticas durante la espermatogénesis que podrían ser responsables de la inestabilidad de los repetidos (Gusella y col., 1993). El RNAm del gen IT15 es normalmente expresado en todas las células del cuerpo, por lo que la expresión del RNAm y de la proteína no presenta cambios significativos en pacientes con EH (Gourfinkel y col., 1997). En el cerebro, la expresión de IT15 es principalmente neuronal, aunque se pueden presentar bajos niveles en la glía. El patrón regional de expresión se correlaciona con la densidad neuronal. Cerebelo, hipocampo y bulbo olfatorio poseen una alta expresión de IT15. Consecuentemente, el estriado expresa entre niveles bajos a niveles intermedios de RNAm IT15. Así, la neuropatología selectiva observada en la EH, la cual se encuentra enfocada hacia el estriado, no puede ser explicada por variaciones regionales en la expresión génica de pacientes con EH.

Recientemente se ha establecido que la huntingtina es segmentada durante la apoptosis por la caspasa-3 (apopain; una proteasa-cisteína) y la tasa de segmentación de esta enzima es aumentada por un incremento en la longitud del tracto de poliglutamina (Wellington y col., 1998). Ya que la huntingtina puede ser expresada ubicuamente, otras proteínas que interactúan con la huntingtina mutada pueden inducir la toxicidad y ser selectivamente expresadas en neuronas que mueren en la EH. Se ha sugerido que la huntingtina interactúa con una gran variedad de proteínas, incluyendo tTGasa, HAP, HIP1, HIP2, microtúbulos, GAPDH, calmodulina, receptor a EGF y la sintasa-β cistationina (Petersen y col., 1999). Múltiples grupos han reportado que las interacciones entre la huntingtina con elementos del citoesqueleto enfatizan el papel potencial de la huntingtina en el transporte vesicular, tráfico intracelular y neurogénesis (Walling y col., 1998). Por ejemplo, la neurodegeneración en EH puede estar relacionado con una alteración dependiente de poliglutamina en la interacción entre huntingtina y proteínas del citoesqueleto, en que una pequeña reducción

en la afinidad de interacción de la huntingtina hacia su sustrato podría alterar el transporte axonal y provocar un síndrome clínico (Walling y col., 1998).

2.2.2. Neuroquímica de EH

Los estudios regionales de varios neurotransmisores, transmisores putativos y neuromoduladores en la EH han tenido gran auge a raíz del hallazgo de la disminución regional de DA en el cuerpo estriado de pacientes que murieron a causa de la EP. Actualmente, se ha comprobado que existen notables alteraciones en el contenido de cobre y hierro en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), así como en la sustancia nigra de cerebros postmortem de pacientes con EH, al ser comparados contra cerebros de pacientes control (Dexter y col., 1991). Este tipo de alteraciones pueden estar asociadas con los procesos neurodegenerativos que involucran alteraciones metabólicas vinculadas a los procesos oxidativos. Los informes iniciales sugieren cambios pequeños en la concentración de DA estriatal, sugiriendo que ésto puede deberse inicialmente a la pérdida de tejido en el cuerpo estriado atrofiado, o bien, a factores como la pérdida de fibras GABAérgicas aferentes del estriado a la sustancia nigra, provocando además una pérdida retrógrada de DA de las terminales dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal (Carrasco y Mukherjiu, 1986; Bird, 1980).

Se ha propuesto que una hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales trae como resultado un incremento en la síntesis y liberación de DA sobre los receptores dopaminérgicos. Esto podría deberse a una inhibición reducida del sistema dopaminérgico estriatal por la degeneración de la vía metabólica del GABA (ácido γ -aminobutírico), aunque estudios con cerebros de pacientes con la EH y cerebros de animales lesionados con KA muestran que las proyecciones nigro-estriatales se adaptan a la pérdida de neuronas estriatales que normalmente inhiben la actividad dopaminérgica (Melamed y col., 1982). De igual manera, se ha reportado que la concentración de GABA disminuye hasta en un 60% en el cuerpo estriado, pero no en la corteza frontal o en el cerebelo de pacientes con EH, mientras que la actividad de la GAD (descarboxilasa del ácido glutámico, la enzima de síntesis del GABA) disminuye en el cuerpo estriado y permanece normal en la corteza frontal (Bird y Eversen, 1974). La reducción del 50% o más de GABA y de la actividad de GAD ha sido interpretada mediante la hipótesis de que las neuronas espinosas estriatales de tamaño mediano que contienen GABA son las que degeneran en la enfermedad (Spokes y

col., 1979). La disminución en la concentración de GABA estriatal ha sido relacionada con la vía aferente del cuerpo estriado a sustancia negra y a *globus pallidus* (Bird, 1974).

Por otra parte, la actividad de la colina acetiltransferasa (CAT), la enzima de síntesis de la acetil-colina, disminuye también en la enfermedad, reflejando la degeneración de las interneuronas colinérgicas estriatales (Aquilonius y Sjostrom, 1971). Asimismo, se ha observado una pérdida de los sitios colinérgicos muscarínicos de unión específica; sin embargo, a diferencia de la EA, la actividad cortical de la CAT se preserva. El papel de las vías noradrenérgicas centrales en la EH no es muy relevante. Los niveles de norepinefrina estriatal se encuentran normales o ligeramente incrementados (Spokes, 1980). Las concentraciones estriatales de serotonina también permanecen normales o ligeramente incrementadas, mientras que en el líquido cefalorraquídeo permanecen normales (Chase, 1973).

La sustancia P, un neuropéptido encontrado en ganglios basales, se ha postulado como un neurotransmisor excitador de la vía aferente del estriado a la sustancia negra. En la EH, la concentración de sustancia P en el *globus pallidus* y la sustancia negra disminuye hasta en un 90%, mientras que en el núcleo caudado disminuye en un 50% y en la zona compacta de la sustancia negra se observa un tercio de la concentración normal, afectando la pars reticulata y la pars compacta. En líquido cefalorraquídeo, la sustancia P permanece normal (Gayle y col., 1978).

Los estudios sobre receptores en la corea han revelado que en general, disminuye el número de sitios de unión para los neurotransmisores en el estriado. Se ha observado una disminución en el número de receptores colinérgicos muscarínicos, así como disminución en receptores para benzodiazepinas, GABA y DA, siendo más evidentes estos cambios en el núcleo caudado (Whitehouse y col., 1985). Recientemente, se han observado anomalías y una gran pérdida en el número de receptores para NMDA en el cuerpo estriado de pacientes con EH (Young y col., 1988). Adicionalmente, se reporta la disminución en las concentraciones de algunos aminoácidos (prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina y tirosina) en plasma y tejido cerebral de pacientes con la enfermedad (Joynt, 1990).

2.2.3. Neuropatología de EH

En la EH hay una pérdida neuronal selectiva en regiones restringidas del cerebro. Las características neuropatológicas más marcadas son la dramática pérdida de neuronas y el desarrollo de astrogliosis en el estriado (MacMillan y Quarrel, 1996). Los cambios progresivos son resultado de una atrofia muy marcada y aproximadamente una reducción del 60% en el área seccional del cuerpo estriado en estados avanzados de la enfermedad, todo ello combinado con una atrofia menos marcada de la neocorteza, dando en conjunto una pérdida aproximada del 30% en el peso total del cerebro (Petersen y col., 1999).

En el neostriado, las neuronas espinales GABAérgicas de dimensión mediana, las cuales constituyen el 95% de todas las neuronas estriatales, son las más afectadas. Ellas constituyen una proyección de neuronas que primariamente inervan a la sustancia negra y al globo pálido y que contienen además encefalina, neuromicina, dinorfina y sustancia P. Hay una preservación relativa de neuronas espinales de dimensión mediana que co-localizan somatostatina, neuropéptido Y y NADPH-diaforasa, así como también de algunas neuronas colinérgicas y una subclase de neuronas GABAérgicas que contienen parvalbúmina (Ranen y col., 1995).

Las neuronas estriatales son divididas dentro de dos compartimientos: parche y matriz que exhiben diferentes características bioquímicas y de conectividad. En estados tempranos de la enfermedad, la neurodegeneración parece enfocarse sólo a los compartimientos de parche (Hedreen y Folstein, 1995). Sin embargo, en casos avanzados de EH, hay una prominente pérdida de neuronas en la matriz, incluyendo a las neuronas que contienen a la proteína calbindina de 28K que se une al calcio (Seto-Oshima y col., 1988).

Por otro lado, la membrana nuclear de las neuronas exhibe un número incrementado de muescas que corresponden a un incremento en la densidad de poros nucleares (Davies y col., 1997). Esto sugiere que el fragmento de la huntingtina es transportado al núcleo donde forma agregados de proteína semejantes a los agregados amiloides, análogos a los priones escrapie y fibrillas β -amiloide de la EA (Scherzinger y col., 1997). Las inclusiones contienen fragmentos terminales NH_2 de la huntingtina mutante, la cual es ubiquitinada.

2.3. Modelos experimentales de EH

Existen diversos modelos experimentales que son útiles en el estudio de EH ya que son capaces de reproducir de manera fisiopatológica las características que se manifiestan en esta neuropatía. Entre los modelos farmacológicos más utilizados se encuentra la administración del ácido quinolinico (QUIN), el ácido kainico (KA) y el ácido 3-nitropropiónico (3-NPA).

2.3.1. Acido quinolinico (QUIN)

El QUIN (también conocido como ácido 2,3-piridín-dicarboxílico) fué identificado por primera vez por Wolfensberger y colaboradores en cerebro de rata y en el tejido cerebral de humanos (Wolfensberger y col., 1983), y posteriormente en cerebro de ratón, conejo y otros mamíferos pequeños (Moroni y col., 1984). En el primer reporte, se observó que el QUIN está presente preferencialmente en núcleo caudado, corteza cerebelar y corteza frontal cerebral. El segundo informe establece que el QUIN está presente en corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral de varios mamíferos.

El QUIN es un metabolito del L-triptofano que se forma en la vía metabólica de la kinurerina (Vender, 1975), que es la mayor vía oxidativa del catabolismo del triptofano. Dicha vía se encuentra representada y resumida esquemáticamente en la Figura 1. Bajo condiciones normales, gran parte del triptofano catabolizado sigue la vía hasta formar acetil-ScoA. Sólo una pequeña proporción del metabolismo del triptofano deriva a otros metabolitos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas de constante disposición de triptofano, la excreción de kinurenina y de metabolitos intermediarios se incrementa considerablemente (Vender, 1975). La vía metabólica de la kinurenina ha sido identificada en cerebro, hígado y esporádicamente en intestinos humanos, así como en cerebro e hígado de rata y otros mamíferos pequeños (Vender, 1975; Wolfensberger y col., 1983; Moroni y col., 1984).

Durante la década de 1990, el QUIN adquirió importancia en el estudio de los procesos patológicos del SNC, no sólo como un modelo de la corea de Huntington, sino también en algunas alteraciones asociadas con otras enfermedades tales como el complejo demencial asociado al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Heyes y col., 1989), en donde se cree que los altos niveles registrados de este aminoácido en líquido

cefalorraquídeo puedan estar implicados en los capítulos demenciales y en la atrofia cerebral observadas en estos pacientes. De hecho, debido a su carácter endógeno, se llegó a proponer al QUIN como el principal agente etiológico potencial en EH. Una primera indicación adicional de lo anterior viene de estudios previos en los cuales se demostraron los efectos excitotóxicos del QUIN (Beal y col., 1986). Otro aspecto importante en esta hipótesis es el hecho de que las lesiones provocadas por concentraciones submicromolares de esta toxina pueden ser prevenidas por el pretratamiento con MK-801, un antagonista no competitivo de los receptores para NMDA, conduciendo a la idea de que las alteraciones observadas en la enfermedad podrían estar mediadas por la excitación de los receptores para NMDA (Young y col., 1988). Adicionalmente, se ha observado que en varias regiones cerebrales de pacientes con EH se presenta un incremento significativo en la actividad de la 3-hidroxiantranilato oxigenasa (la enzima de síntesis del ácido quinolínico) (Schwarcz y col., 1988).

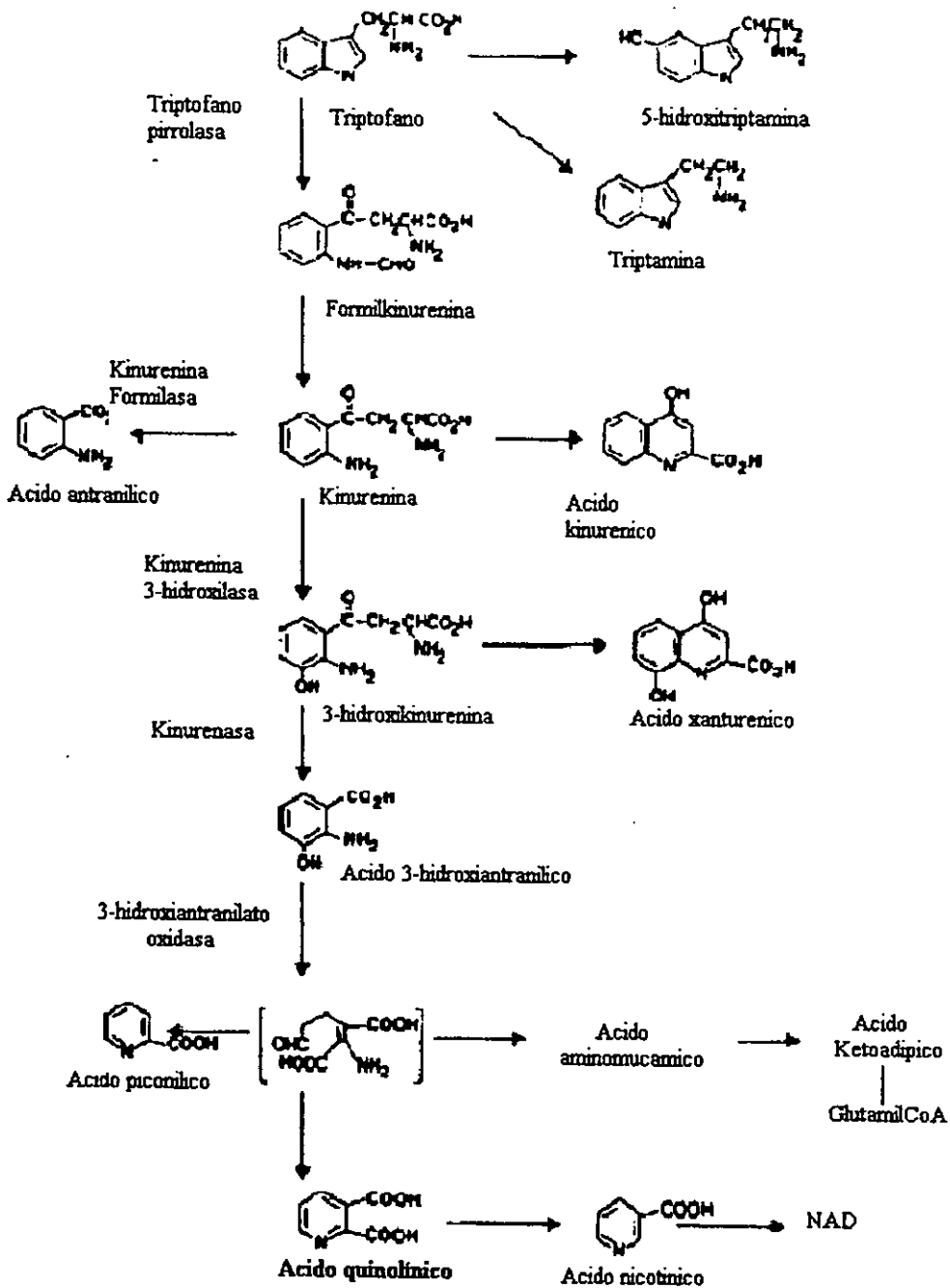


Fig. 1. Via metabólica de la kynurenina (Bryn y Stoof, 1990).

A partir de un método espectrofotométrico en masa se obtuvieron valores por arriba de 12 pmol/mg de proteína (ó 2.1 nmol/g de tejido) de QUIN en el cerebro de ratas (Lombardi y col., 1983) y un incremento de 150% en sus concentraciones en respuesta a una dosis de triptofano. Estos valores representan concentraciones en el cerebro de aproximadamente 2 μ M y al parecer exhiben un considerable grado de heterogeneidad, con altos niveles registrados en zonas como la neocorteza (2.1 nmol/g) y el estriado inferior (0.6 nmol/g).

El QUIN también está presente en cerebros humanos post-mortem en niveles muy similares a aquellos existentes en la rata y otras especies (Wolfensberger y col., 1984). Las concentraciones de QUIN no varían grandemente en las diferentes regiones del cerebro y la mayoría está presente en concentraciones micromolares. Así, la corteza cerebral (con aproximadamente 2 nmol/g de tejido) generalmente tiene niveles de 2 a 4 veces más altos que los presentes en el estriado (Wolfensberger y col., 1984; Moroni y col., 1984).

En vista de la localización diferencial de QUIN en tejido cerebral, la conclusión sobre su metabolismo parece ser que la síntesis del mismo se encuentra en una población de células gliales y puede presumiblemente existir en aquellas células donde es metabolizado por la quinolinato fosforribosiltransferasa (QPRT), en una población separada de células gliales y neuronas conteniendo esta enzima (Stone, 1993). Sin embargo, se ha establecido que existe un alto grado de compartamentación del QUIN dentro de las células. Si esto indica que el QUIN necesita ser concentrado en compartimientos subcelulares, entonces las concentraciones dentro de aquellos compartimientos podrían ser sustancialmente más altas que en el tejido externo y podrían alcanzar el rango al cual el QUIN exógeno llega a ser neurotóxico (Stone, 1993). Por otro lado, se ha reportado que la actividad de la enzima de síntesis del QUIN, la 3-hidroxiantranilato oxidasa (3-HAO), se encuentra drásticamente incrementada en varias regiones cerebrales de pacientes con EH (Schwarcz y col., 1988). Aparentemente, el cerebro de pacientes con EH tiene una elevada capacidad para generar endógenamente la excitotoxina y el hecho de que las enzimas catabolizantes y de síntesis del QUIN estén presentes en diferentes células, sugiere que la síntesis de QUIN ocurre en células que no pueden catabolizar este compuesto a concentraciones muy altas. Entonces, si una relativa sobreproducción de la toxina tiene lugar, el QUIN puede ser expulsado hacia el espacio extracelular y originar una sobreactivación de los receptores tipo NMDA (Bruyn y Stoof, 1990).

El modelo de EH generado por el QUIN y propuesto por Schwarcz y colaboradores en 1984 describe una destrucción neural selectiva después de la administración intraestriatal de esta neurotoxina. En dicho modelo se aplica la teoría de la excitotoxicidad para explicar la acción tóxica del QUIN. La Figura 2 resume el mecanismo hipotético por el cual se pretende explicar la degeneración neural.

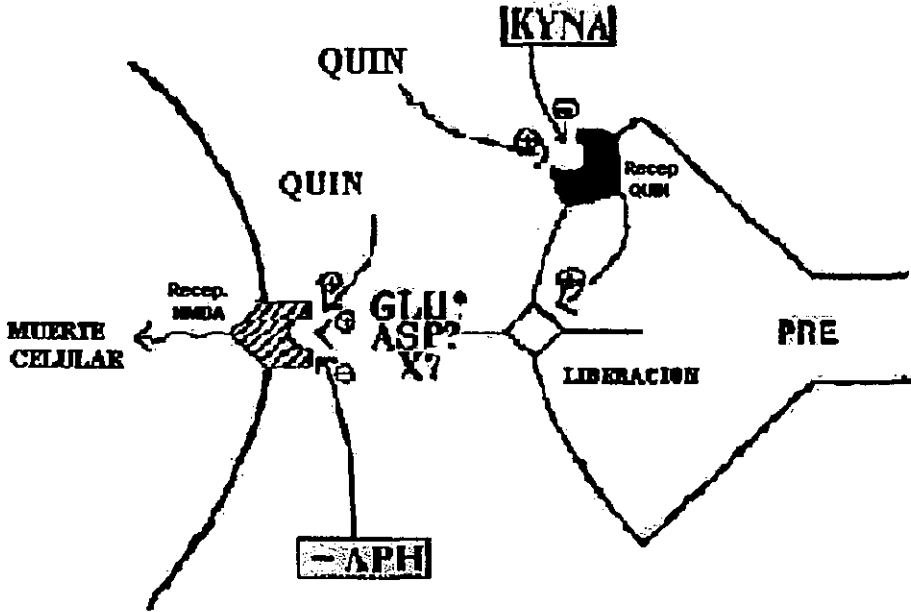


Fig. 2. Mecanismo excitotóxico del QUIN (Schwarz y col., 1984)

Según este modelo, el QUIN puede actuar sobre receptores presinápticos específicos, induciendo la liberación de un posible transmisor endógeno que a su vez puede unirse a un receptor postsináptico del tipo NMDA en las neuronas blanco, causando los procesos neurodegenerativos. Adicionalmente el QUIN puede unirse a receptores postsinápticos para NMDA. Parece claro que el resultado final de la aplicación de las excitotoxinas al SNC es una activación de las neuronas y es posible entonces que las células susceptibles sean simplemente "excitadas hasta la muerte".

La administración de QUIN induce un incremento en el contenido de calcio intracelular, iniciando la liberación intracelular de calcio de depósitos intracelulares y la activación posterior de canales iónicos a través de los cuales sodio, potasio y calcio pueden pasar en grandes cantidades (Lu y col., 1991). La despolarización de la membrana da como

resultado una activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales pueden permear suficiente calcio para contribuir al daño neuronal (Weiss y col., 1990). Cuando se administra directamente dentro del estriado de la rata, el QUIN produce lesiones tipo "axon sparing" o de axones preservados, con marcada pérdida de dendritas, vacuolización y pérdida de la estructura en sitios postsinápticos, pero generalmente buena preservación de terminales presinápticas.

El QUIN es capaz de inducir cambios fisicoquímicos en la estructura membranal de eritrocitos humanos (Farmer y Butterfield, 1985). Un deterioro en el citoesqueleto puede traer como consecuencia un flujo de aminoácidos originando así una cascada de eventos que culminan con la muerte celular por apoptosis. La pérdida de rigidez del citoesqueleto puede contribuir de esta manera a la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, extendiendo el daño. Otro interesante descubrimiento fue reportado por Ríos y Santamaría en 1991, quienes examinaron la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico inducida por el QUIN como un índice del daño a membrana por la peroxidación lipídica en homogenados de cerebro de rata. El QUIN, a concentraciones entre 20 y 80 μM , incrementó la proporción de la peroxidación lipídica significativamente (Ríos y Santamaría, 1991; Santamaría y Ríos, 1993) observándose sus máximos efectos tóxicos a 2 horas después de la administración intraestriatal.

Beal y col. (1989) enfatizaron que en la EH, el sparing de algunas neuronas es sólo un aspecto relativo, y en los casos patológicos más severos, hay una pérdida de todos los tipos neuronales. En este punto cabe mencionar la existencia de marcadores adicionales de algunos grupos específicos neuronales, tales como la NADPH diaforasa. Esta enzima ha sido encontrada histoquímicamente en SNC y se ha observado que las neuronas estriatales que contienen esta enzima son preservadas selectivamente en la enfermedad (Ferrante y col., 1984), lo cual ocurre frecuentemente con la co-localización de somatostatina y neuropéptido Y. Desde hace algunos años se ha sugerido que neuronas conteniendo NADPH-diaforasa son más resistentes a la toxicidad con QUIN (Kowall y col., 1987). Así, se han propuesto dos teorías: la primera establece que la NADPH diaforasa es una sintasa del NO y por tal motivo se encarga de proteger a las neuronas; o bien, que la NADHP-diaforasa actúa como enzima citoplasmática o a nivel de terminales nerviosas que tiene como función capturar al QUIN y descomponerlo en moléculas menos tóxicas para la neurona.

La resistencia es también indicada para NMDA, pero no para glutamato, ácido quiscuálico o KA. Sin embargo, neuronas que contienen somatostanina en el estriado y el hipocampo

reaccionan directamente a la lesión de las excitotoxinas.

En 1992, Qin observó que inyecciones intraestriatales de QUIN deprimen la actividad de la GAD. El argumento más frecuentemente aceptado para el desempeño del QUIN en los desórdenes neurodegenerativos es que las concentraciones de esta toxina necesarias para inducir daño neural se encuentran muy por arriba de las encontradas *in vivo*. Esto indica que concentraciones de 250 a 400 μM de QUIN son necesarias para inducir signos de daño en cultivos neocorticales, cuando se exponen por más de 96 horas (Kim y Choi., 1991).

2.3.2. Acido kaínico (KA)

El ácido kaínico (KA) ha sido considerado como un importante compuesto para las funciones relacionadas con la transmisión de aminoácidos excitadores en los invertebrados y mamíferos durante los últimos veinte años. Originalmente, el KA (Fig. 3) fue aislado del alga *Digenea simplex* y fue usado como agente antiacarísida en Japón después de la guerra. Shinozaki y Konishi en 1970, describieron su fuerte acción sobre neuronas del SNC de mamíferos (Sperk, 1994).

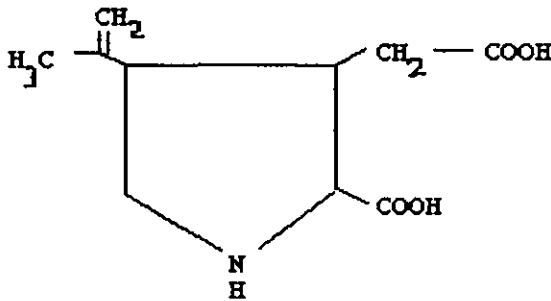


Fig. 3. Estructura del ácido kaínico (Schwarcz, 1984).

Existen dos propiedades que posee el KA y que han tenido gran impacto para las neurociencias durante los últimos 15 años: primero, el KA inyectado localmente dentro de áreas cerebrales produce lesiones de axones preservados (Coyle y col., 1978); y segundo, el KA ejerce potentes crisis cuando se aplica sistémicamente dentro del fluido cerebroespinal, o localmente dentro de las áreas límbicas del cerebro (Nadler y Cuthbertson., 1980). El uso del KA para producir la destrucción del pericarion y las dendritas en el sitio de la inyección local con preservación de células gliales y axones, pasando a través de la barrera hematoencefálica, llegó a ser popular por los trabajos de Coyle y Schwarcz (1976) y McGeer y Mcgeer (1976), reproduciendo los cambios neuroquímicos observados en EH. El modo más conveniente de aplicación del KA es por rutas sistémicas: una dosis de 8-12 mg/kg aplicada vía subcutánea, intraperitoneal o intravenosa, trae como resultado severas crisis en la rata. Dependiendo de la ruta de aplicación de KA, las crisis motoras límbicas pueden proceder a diferentes estados de severidad (Sperk, 1994).

La inspección macroscópica de los cerebros de animales sacrificados durante un periodo de tiempos cortos después de las crisis motoras inducidas por KA (90 min después de la administración sistémica o después) revela un incremento en el volumen de los hemisferios (especialmente los lóbulos temporales); otras regiones (corteza frontal, cerebelo y partes caudales del tallo cerebral) son macroscópicamente normales (Ben-Ari y col., 1980). Después de su inyección sistémica o intracerebral, el KA puede alcanzar áreas vulnerables del cerebro e inducir lesiones de tipo axón-preservedo (Sperk y col., 1994).

Incrementos dramáticos en los niveles de serotonina y ácido 5-hidroxi-indolacético fueron observados durante y después de 1-3 días posteriores a las sacudidas de "perro mojado" o las crisis inducidas por la administración aguda de KA (Sperk y col., 1983). Un incremento similar fue determinado para el metabolito de la DA y el ácido homovanílico, en el estriado/pálido.

El KA al parecer ejerce su acción tóxica, al menos en parte, aumentando la liberación de glutamato a partir de los receptores presinápticos (Ferkany y col., 1982). Durante las crisis agudas inducidas por KA, se alcanza la liberación de glutamato, taurina y fosfoenolamina en el hipocampo, y de glutamato en la corteza piriforme (Lehman y col., 1985).

2.3.3. Acido 3-nitropropiónico (3-NPA)

El 3-NPA es un compuesto natural que se encuentra abundantemente distribuido en plantas y hongos, ha sido asociado recientemente con una mayor incidencia de enfermedades neurológicas en animales y humanos. La ingesta de este compuesto *in vivo* trae como resultado disnea, debilidad en los miembros, mal funcionamiento de los mismos con movimientos torpes mientras el individuo camina (paso de ganso). La enfermedad en el humano ocurrió en China después de la ingestión de granos que contenían al hongo *Arthrinium*. Asimismo, diversos estudios han indicado que los cultivos del hongo *Arthrinium*, al ser ingeridos, producen parálisis en ratón y en gatos, así como crisis en perros, exhibiendo neurotoxicidad; la examinación patológica de estos animales revela edema cerebral similar al observado en pacientes envenenados con este hongo (Liu, 1986). La enfermedad se caracteriza inicialmente por trastornos gastrointestinales, seguida por encefalopatías con estupor y coma. Los pacientes expresan tics faciales, tortícolis, distonia y movimientos semejantes a sacudidas (Beal y col., 1993).

El 3-NPA es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa (SDH). La SDH juega un papel central en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y en la cadena de transporte electrónico (como un componente del complejo II). Estudios detallados por Alston y col. (1977) demostraron que cuando adicionaban 3-NPA a mitocondrias de hígado de rata, la tasa de consumo de oxígeno decrecía a cero. Además de estar involucrado en la inhibición metabólica de neuronas, el 3-NPA se ha asociado a niveles elevados de glutamato y dopamina que producen una acción neurotóxica (Page y col., 2000). Alternativamente, la neurotoxicidad inducida por el 3-NPA puede depender de un desajuste de la barrera hematoencefálica siguiendo la inhibición metabólica y muerte de astrocitos, originando una hemorragia estriatal localizada (Nishino y col., 1997). Hay evidencia que soporta el papel del óxido nítrico y la generación de OH^\cdot en la toxicidad inducida por 3-NPA, así como evidencia que nos propone a la apoptosis como un mecanismo neurodegenerativo por el 3-NPA en un modelo *in vitro* también como en la EH (Pang y Geddes, 1997).

La inactivación de la SDH por el 3-NPA requiere que el nitroalcano este en su forma carbanión. El centro mitocondrial, el cual es el sitio de interacción por el 3-NPA y SDH, es más alcalino que el citosol y podría protonar la formación carbanión. Como lo indica la Fig. 4, Coles y col. (1979), propuso la inactivación de la SDH por el 3-NPA en dos etapas. En la primera etapa, el dianión de 3-NPA es oxidado a 3-nitroacrilato por la transferencia

de dos electrones al componente flavin. En la segunda etapa, el grupo thiol de SDH interactúa con 3-nitroacrilato para formar un tioeter y el grupo flavin es reoxidado por la cadena respiratoria.

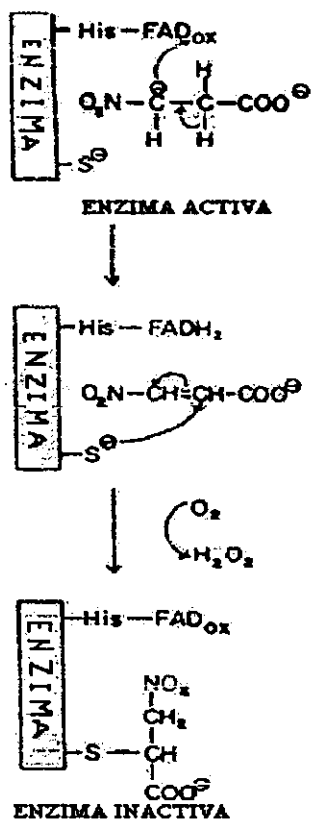


Fig. 4. Inactivación de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), (Coles y col., 1979).

El signo temprano de la disminución en el metabolismo energético, es una disminución en la tasa de fosfocreatina/creatina (Erecinska y Nelson, 1994). En la fase inicial de intoxicación, el 3-NPA inhibe selectivamente el ciclo del ácido cítrico de neuronas GABAérgicas; la actividad glial permanece inalterada a través del tiempo (Hassel y Sonnewald, 1995). Estos estudios pueden explicar porque las neuronas del caudado/putámen, las cuales son GABAérgicas, son selectivamente dañadas por el 3-NPA. Algunos autores han sugerido que la disminución en el metabolismo energético por el 3-NPA puede originar muerte neural por un mecanismo excitotóxico y formación de

radicales libres (Schulz y col., 1995). La disminución en el metabolismo energético y estrés oxidativo pueden jugar un papel importante en la patogénesis de eventos neurodegenerativos.

La síntesis de 3-NPA se presenta en la figura 5.

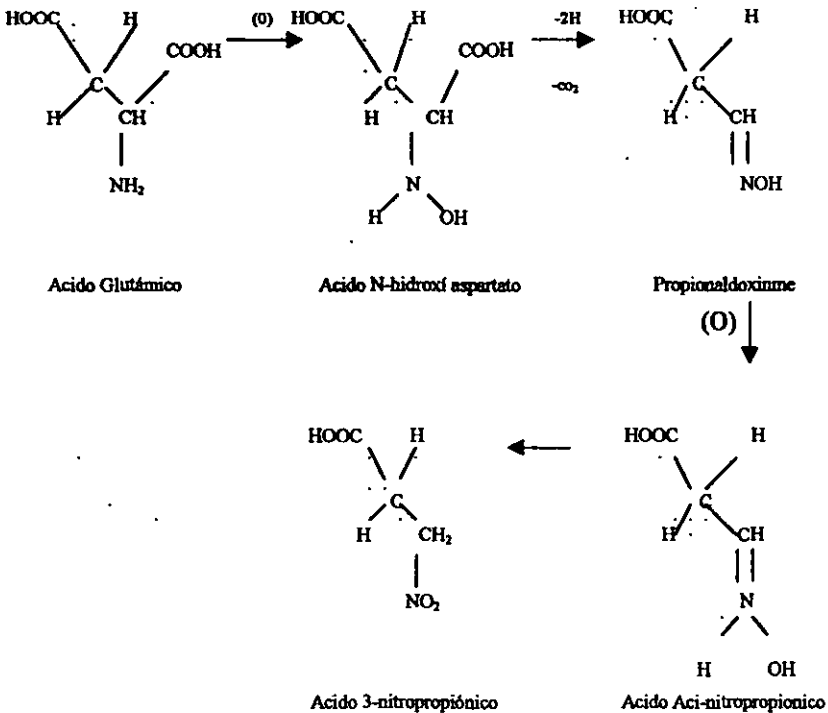


Fig.5. Ruta Biosintética de ácido 3-nitropropiónico (Conn, 1988).

Estudios *in vivo* sobre administración sistémica de 3-NPA han indicado que existe una gran vulnerabilidad del estriado comparada con otras regiones expuestas a 3-NPA. Las razones para este aspecto son aún desconocidas, pero quizá puedan estar relacionadas a otros aspectos además que una vulnerabilidad celular de 3-NPA *per se* (Zeevalk, 2000). El rompimiento de la barrera hematoencefálica a nivel del estriado, puede contribuir a la vulnerabilidad de esta estructura a 3-NPA (Nishino y col., 1995).

El 3-NPA ha sido utilizado como una herramienta para mimetizar importantes síntomas conductuales de la EH. Este produce anomalías motoras y déficit cognitivo, incluyendo déficits en la memoria. Los déficits conductuales exhibidos por administración de 3-NPA se asemejan a aquellos establecidos en pacientes con EH tardía; sin embargo, el empleo de QUIN produce cambios conductuales que mimetizan más los síntomas tempranos de pacientes con EH. La simulación más aguda de EH es producida cuando el 3-NPA es administrado crónica o sistémicamente (Dunbar y col., 2000). La mayor ventaja del 3-NPA sobre las demás excitotoxinas son las lesiones estriatales selectivas que pueden llevarse a cabo vía administración sistémica; asimismo, el animal no está expuesto a trauma asociado con inyecciones intraparenquimales de la toxina (Borlongan y col., 1995). Debido a que la EH comprende daño putaminal y la administración sistémica de 3-NPA ha sido sugerida por producir similar daño en monos (Brouillet y col., 1995), la demarcación del caudado a partir del putamen parece inhibir mecanismos compensatorios del caudado al putamen, y así la corea es observada.

Una clave importante acerca del mecanismo de toxicidad del 3-NPA fue la observación por Hamilton y Gould (1987) quienes establecieron que el daño neuronal producido por la administración sistémica de 3-NPA es resultado de un mecanismo excitotóxico. Al parecer la excitotoxicidad induce una muerte necrótica o apoptótica (Sato y col., 1997). Sin embargo, la muerte apoptótica fue bloqueada por ciclohexamida, pero no por antagonistas de NMDA; estos resultados demuestran que el 3-NPA puede dar una rápida muerte necrótica involucrando los receptores NMDA, o una lenta muerte apoptótica independiente de los receptores a NMDA; sin embargo, aún no está totalmente explicado el daño regional producido por la administración sistémica de 3-NPA (Geddes y col., 2000). Al parecer el debilitamiento progresivo en el metabolismo mitocondrial producto de la administración de 3-NPA podría, como resultado final, "asesinar" a las células. El 3-NPA produce un declinamiento gradual en los niveles de ATP neural, lo que podría ocasionar que las cinasas dependientes de ATP tengan un mal funcionamiento y no puedan regular los gradientes iónicos del interior neural (Geddes y col., 2000). Asimismo, el estrés oxidativo puede traer como resultado una muerte celular necrótica o apoptótica, dependiendo de la severidad del insulto. Estudios *in vitro* han detectado un incremento en el estrés oxidativo en neuronas tratadas con 3-NPA; simultáneamente, hay evidencia *in vivo* de un incremento en la formación de radicales en ratas tratadas con 3-NPA (Fu y col., 1995). Así, mucho del estrés oxidativo detectado *in vivo* siguiendo la administración de 3-NPA trae como

resultado mecanismos inflamatorios secundarios al daño neuronal inicial (Geddes y col., 2000). Por otro lado, los receptores ionotrópicos, particularmente los receptores NMDA, median la muerte necrótica, pero no la apoptótica (Geddes y col., 2000). Sin embargo, estos resultados no explican la preferencial vulnerabilidad del estriado al daño neural seguido por la administración de 3-NPA.

El ácido 3-NPA inyectado intraestriatalmente a ratas y primates no humanos, produce lesiones dependientes de la dosis con pérdida neuronal y gliosis. Con ésto se observa que neuroquímicamente, existe una disminución de GABA, sustancia P, somatostatina, neuropéptido Y y DA. Las lesiones ocasionadas producen un decrecimiento de ATP a las 3 horas, el cual llega a persistir hasta 24 horas después de la inyección (Beal, 1993). Utilizando pruebas de resonancia magnética, se ha observado que existe acumulación de lactato en los ganglios basales. Las lesiones fueron significativamente dependientes de la edad, observándose mayor número de lesiones en animales adultos y jóvenes-adultos que en juveniles. La administración de 3-NPA por tanto, da como resultado lesiones típicas del estriado dorsolateral, en el cual se exhibe pérdida de neuronas y gliosis. También se ha encontrado una sobrevivencia de neuronas conteniendo NADPH-diaforasa, cambios proliferativos en las dendritas y neuronas espinales, con recurvaturas e incremento en el número de espinas. Estudios en primates no humanos sugieren que la administración crónica de 3-NPA trae como resultado discinesia orofacial, distonia, discinesia de las extremidades y movimientos coreiformes tipo EH (Coyle y Puttfarcken., 1993). Por otro lado, hay evidencia que los niveles de GSH dentro de la mitocondria son los encargados de hacer frente al daño oxidativo inducido por 3-NPA; cuando estos niveles son disminuidos, los hidroperóxidos se acumulan, dando como resultado un extenso daño mitocondrial (Meister, 1994). Otros antioxidantes pueden estar involucrados en la protección de la mitocondria; sin embargo, el GSH es el principal. La mitocondria no contiene catalasa, por tal motivo, depende de la acción antioxidante de GSH y GPx (Meister, 1994). Reportes de microscopia electrónica han revelado que el daño mitocondrial es una importante consecuencia de la deficiencia de glutatión en muchos tejidos (Meister, 1994).

2.4. Tipos de receptores glutamatérgicos

La caracterización farmacológica de los receptores glutamatérgicos en años recientes sugiere la existencia de al menos tres tipos diferentes de receptores ionotrópicos: 1) Receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA), 2) Receptores para ácido 3-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), y 3) Receptores para kainato (KA). Los receptores para KA y AMPA pueden, en algunas instancias, operar en el mismo canal iónico, sugiriendo que sus sitios de anclaje pueden formar parte del mismo complejo canal-receptor (Grisham, 1992).

La identificación de las múltiples subunidades que constituyen a los canales-receptores NMDA revela que son diferentes en arquitectura molecular y propiedades funcionales, dependiendo de las regiones y estados de desarrollo en que se estudien (Mishina y col., 1993). Las subunidades del receptor NMDA contienen cuatro segmentos hidrofóbicos (M1-M4) en la mitad de las moléculas. Estas características son comunes para los canales iónicos sensibles a neurotransmisores, tales como los canales del receptor para acetilcolina, GABA y glicina. Todas las subunidades del canal receptor para NMDA poseen asparagina en el segmento M2, en la posición correspondiente a la glutamina o asparagina y que determina la permeabilidad del calcio en estos canales; el segmento M2 puede enlazarse en el interior de la membrana plasmática (No y Oswald., 1995) y es este mismo segmento el que determina el paso de corriente iónica a través del canal.

Por otro lado, el receptor para KA es selectivamente sensible a KA (un agonista glutamatérgico) y es capaz de regular un canal permeable a sodio y potasio. Un segundo receptor a KA-quisqualato tipo-A es sensible a AMPA y regula también un canal permeable a sodio y potasio muy similar a los canales-receptores activados por KA. Un último tipo de receptor glutamatérgico caracterizado es el receptor a quisqualato tipo-B. Este tipo de receptor es de naturaleza metabotrópica; es decir, actúa a través de segundos mensajeros, estimulando la actividad de la fosfolipasa C (PLC) y dando origen así a la formación de segundos mensajeros llamados 1,4,5- inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2) (Kandel y col., 1991).

Existen diversos sitios moduladores de la actividad del receptor NMDA. Recientemente, se ha descrito un sitio modulador designado como sitio redox (Sucker, 1991). Este sitio es de particular interés ya que actúa como un mecanismo de control para el flujo de corriente a través de los canales del receptor NMDA y puede llegar a afectar el grado de

neurotoxicidad producida por la activación excesiva de dichos receptores. El sitio redox modulador es regulado por la reducción del sulfhidrilo y por agentes oxidantes, enfatizando la existencia de puentes disulfuro sobre el complejo canal-receptor para NMDA. La aplicación extracelular de glutatión oxidado (GSSG) pero no de reducido (GSH), inhibe las respuestas mediadas por la activación de los receptores NMDA en cultivos de células ganglionares retinales, *in vivo*, en neuronas corticales de ratas (Sucker, 1991). Se sugiere así, que la aplicación de GSSG ejerce una regulación en el sitio redox modulador del receptor NMDA.

El receptor para NMDA es el único receptor glutamatérgico capaz de permear calcio; además, requiere de un co-agonista que es la glicina para que funcione correctamente. En el interior de las células se encuentran sistemas de segundos mensajeros que son capaces de fosforilar proteínas para dar respuestas celulares. El sistema diacil-glicerol es capaz de anclar en la membrana celular a la proteína-cinasa C (PKC), y ésta, a su vez, es capaz de incrementar la probabilidad de apertura de los canales del receptor NMDA. Por consiguiente, gracias a que la PKC fosforila al receptor NMDA, hace que el magnesio sea menos afín a su sitio receptor, aumentando la constante de disociación del mismo, y por tanto, la corriente de calcio intracelular se ve incrementada al igual que la actividad de PKC para generar mayor fosforilación de proteínas blanco que generan respuestas celulares (Chen y Mae Huang, 1992).

2.5. Excitotoxicidad

Existen diferentes modelos experimentales de neurodegeneración que han sido sugeridos como relevantes para la EH. La excitotoxicidad y el estrés oxidativo son dos condiciones que conducen a la muerte celular y que son conocidas por su importancia en diversas enfermedades neurodegenerativas (Coyle y Puttfarcken, 1993). Ambos procesos pueden ser parte de un círculo de retroalimentación positiva, el cual se inicia por un debilitamiento en la función mitocondrial, dando como resultado una falta de energía en la célula (Beal y col., 1993). La expresión del término "excitotoxicidad" fue acuñada en 1969 (Olney, 1969) como una descripción del efecto tóxico de aminoácidos excitadores sobre el SNC, los cuales destruyen a las neuronas en el sitio de la inyección. Hoy se sabe que la excitotoxicidad juega un papel crucial en la patogénesis de la EH (Fig. 6).

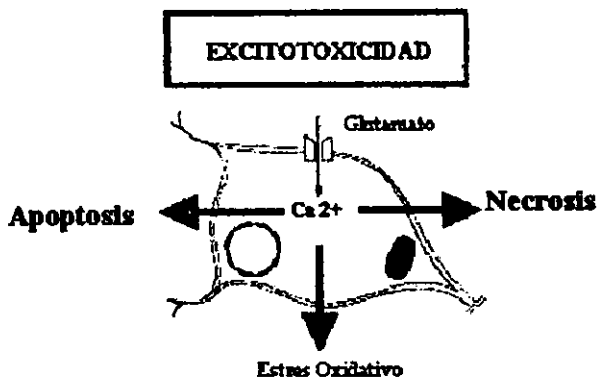


Fig. 6. Mecanismo de excitotoxicidad (Petersén et al, 1999).

Las primeras observaciones ligadas a la excitotoxicidad para la EH se encontraron cuando inyecciones intraestriales de KA produjeron lesiones similares a las observadas con la enfermedad (MacGeer y col., 1978). En el sitio de la inyección, el estriado presenta una pérdida de neuronas, donde las fibras aferentes, componentes no-neurales e interneuronas estriales largas permanecen preservadas, lo que sugirió que el glutamato juega un papel central en la patogénesis de la EH. Sin embargo, la distribución en la pérdida neuronal en la EH no se correlaciona con la densidad de receptores NMDA en el cerebro (Monaghan y col., 1989). La excitotoxicidad podría también generar una reducción en la captura del glutamato por las células gliales. También se ha sido propuesto que transportadores defectivos de glutamato son componentes importantes en las enfermedades degenerativas (Gu y col., 1996), pues al parecer hay una marcada reducción en la expresión de RNAm de GLT1 en células gliales del putamen en pacientes con la EH y un incremento en el número de células conteniendo GLT1 en el estriado que puede deberse a la astrogliosis asociada a la pérdida neural (Arzberger y col., 1997).

2.5.1. Estrés oxidativo celular

Los radicales libres (RL), como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), poseen un electrón desapareado en uno de sus orbitales y son altamente tóxicos para las células. Cuando se presentan en concentraciones excesivas dan origen a una situación llamada estrés oxidativo (Dugan y col., 1995). Esta puede, por ejemplo, ser consecuencia de una mala función mitocondrial o de la excitotoxicidad y puede iniciar el mecanismo apoptótico bajo ciertas condiciones (Fig. 7). Un incremento en el contenido de calcio intracelular puede a su vez activar a la PLA₂ y a proteasas dependientes de calcio. La excesiva activación de la PLA₂ trae como resultado un incremento en la producción de ácido araquidónico (AA) y el subsecuente metabolismo del AA puede inducir la formación de RL.

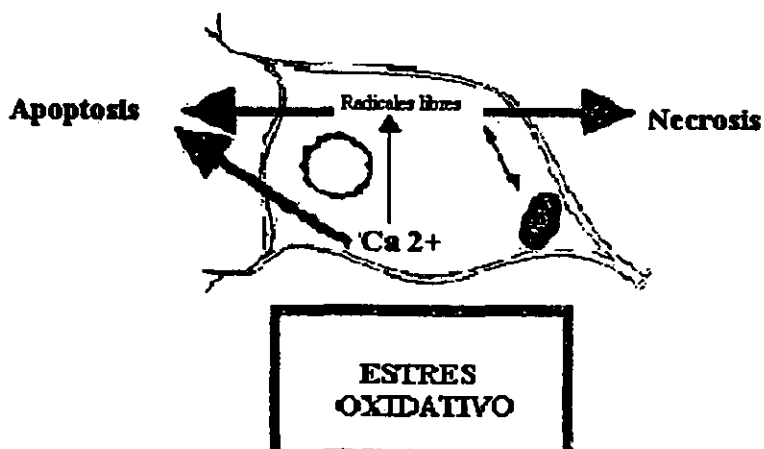


Fig. 7. Mecanismo de estrés oxidativo (Petersén y col., 1999).

Los H₂O₂ y O₂⁻ que son formados a través de la activación de proteasas dependientes de calcio, y H₂O₂ que pueden ser convertidos a OH⁻, contribuirán a la neurotoxicidad (Nakao, 1996). El óxido nítrico (NO) también se presenta como un radical tóxico, se le conoce como un segundo mensajero difusible que actúa en la relajación endotelial (EDRF). Este se genera como resultado de la activación de la sintasa del óxido nítrico (NOS) y es un mediador de la toxicidad de los receptores NMDA en cultivos celulares (Dawson y col., 1991). Asimismo, el NO⁻ reacciona rápidamente con el O₂⁻ para dar origen al anión peroxinitrito(ONOO⁻) (Fig. 8). Bajo ciertas condiciones como la falta de energía y elevada concentración de calcio

intracelular, la xantina deshidrogenasa es convertida a xantina oxidasa por las proteasas dependientes de calcio. La conversión de hipoxantina acumulada y xantina por la xantina oxidasa a ácido úrico genera $O_2^{\cdot -}$ que puede seguir el camino descrito anteriormente (Fig. 8) (Zentella y col., 1994).

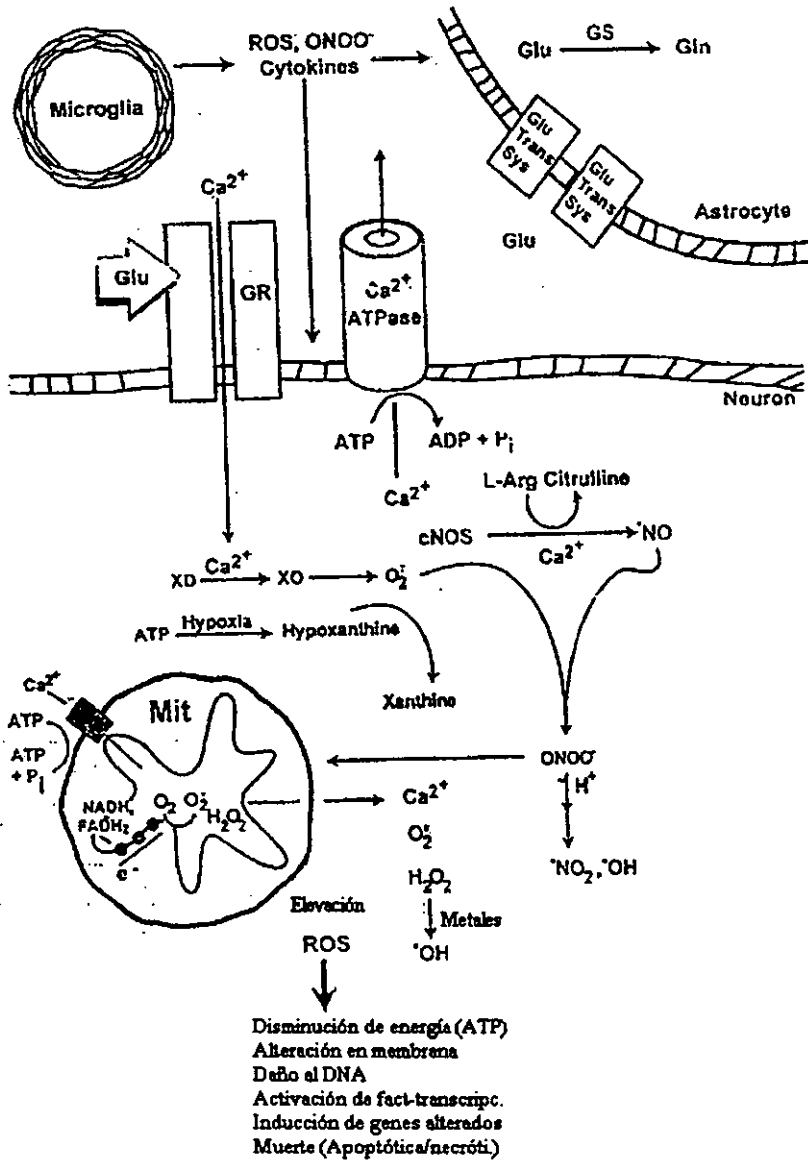
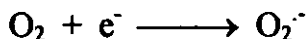


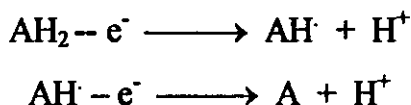
Fig. 8. Daño neuronal excitotóxico (Hensley y col., 1998).

2.5.2. Radicales libres y actividad endógena

Los RL son especies electrónicas, ya sea atómicas o moleculares, capaces de existir independientemente o conjugados, y como ya se mencionó, contienen uno o más electrones desapareados. Dichos electrones generan un fuerte campo paramagnético que ocasiona que la especie química sea altamente reactiva (Zentella y col., 1994). Los RL son generados a partir de muchos elementos químicos y probablemente los de mayor importancia desde el punto de vista biológico son los derivados del hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno, así como los formados por los metales de transición hierro y cobre, entre otros. Los RL pueden obtenerse por ganancia de un electrón a partir de un no-radical; por ejemplo, cuando una molécula de oxígeno gana un electrón da lugar al radical superóxido, como se muestra a continuación:



También la pérdida de un electrón a partir de un no-radical, como por ejemplo, la oxidación del ácido ascórbico (AH_2) a su forma dehidrica (A), pasa por un intermediario que es un RL (AH^{\cdot}), como se muestra a continuación:



En ambos ejemplos, los RL se forman fácilmente cuando se rompe una unión covalente. En contraste con las bacterias obligatoriamente anaerobias, los organismos aeróbios han desarrollado sistemas muy elaborados de protección que funcionan como atrapadores de los RL para prevenir el daño que estos pueden producir (Zentella y col., 1994). Cuando ocurre el daño celular, éste se debe muy posiblemente a que los sistemas de protección son insuficientes para hacer frente a los RL, o bien, que dichos sistemas se encuentran deteriorados. Tal es el caso de algunas enfermedades neurodegenerativas (Zentella y col., 1993).

Diversas enzimas expresadas en el cerebro, incluyendo la monoamino-oxidasa (MAO), la tirosina-hidroxilasa y la L-amino-oxidasa, producen H_2O_2 como un biproducto normal de su actividad (Coyle y Puttfarcken, 1993).

2.5.3. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

El metabolismo oxidativo proporciona una enorme ventaja metabólica para organismos aeróbios ya que exhiben una completa combustión de la glucosa para generar dióxido de carbono, agua y 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa consumida. Sin embargo, en los organismos aeróbios, un metabolismo inapropiado del oxígeno puede dar origen a toxicidad en las células y tejidos (Zentella y col., 1994).

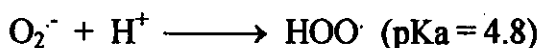
La molécula de oxígeno es un birradial pues tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en un orbital diferente y con su giro (spin) en la misma dirección ($\uparrow\uparrow$). Este arreglo molecular determina una menor habilidad del oxígeno para aceptar un par de electrones de otra molécula cuyos electrones periféricos se encuentran rotando con spin antiparalelo ($\uparrow\downarrow$), lo que restringe las posibilidades de reducción del oxígeno, las cuales tienden a llevarse a cabo mediante la aceptación de los electrones de uno en uno, existiendo retardo en las reacciones con especies no-radicales (Zentella y col., 1993), como se muestra en la Tabla I:

TABLA I. Distribución electrónica en el orbital periférico de las diferentes formas del oxígeno

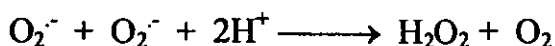
Estado	Electrones periféricos		Reactividad
Oxígeno molecular	\uparrow	\uparrow	Baja
Singulete de O ₂ delta	$\uparrow\downarrow$		Alta
Radical hidroxilo	$\uparrow\downarrow$	\uparrow	Baja
Ión peróxido	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	Baja
Singulete de O ₂ sigma	\uparrow	\downarrow	Muy baja

Los ROS pueden atacar a proteínas, ácidos nucleicos y membranas lipídicas, además de causar alteraciones celulares y afectar la integridad de la célula. Ya que el cerebro contiene una gran cantidad de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), es particularmente vulnerable al ataque de los RL a causa de la remoción de átomos de hidrógeno de los enlaces en los PUFA por los ROS tales como el OH·. Además, los radicales lipoperóxidos pueden combinarse con un átomo de hidrógeno extraído para formar hidroperóxidos lipídicos, los cuales en presencia de Fe²⁺ descomponen a los radicales alcoxy y aldehídos. De esta forma generan el principio para que la acción de un simple radical OH· inicie una reacción en cadena que genera numerosas especies tóxicas, volviendo rígida a la membrana por unión cruzada, interrumpiendo la integridad membranal y causando un daño peroxidativo a proteínas membranales (Grisham, 1992).

Como ya se menciona, la reducción univalente (1e⁻) del oxígeno molecular da origen al radical O₂⁻. Esta reacción también se produce por el sistema NADPH-oxidasa presente en la superficie de las células que participan en las reacciones inflamatorias: neutrófilos basófilos, eosinófilos y macrófagos. En el organismo varias enzimas catalizan esta reacción: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, flavin deshidrogenasas, peroxidasas, etc. (Zentella *et al.*, 1993). El O₂⁻ es un RL no estable que se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado, el radical hidroperóxido (HOO·):



En un ambiente acuoso, el O₂⁻ puede rápida y espontáneamente dismutarse y dar H₂O₂ y O₂.

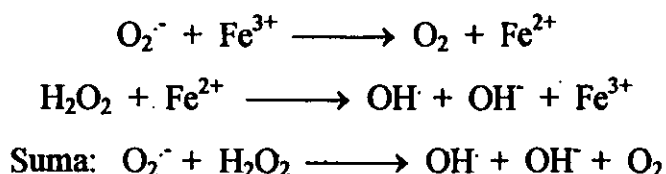


En general, el radical superóxido no es en si un radical demasiado tóxico, pero si es importante ya que puede generar RL secundarios mucho más tóxicos, como lo es el OH·. Por otro lado, el pH es sumamente importante para elevar las concentraciones de HOO·. El radical hidroperóxido es mucho más potente en cuanto a toxicidad que el O₂⁻, ya que posee la capacidad de iniciar la peroxidación lipídica, así como también la oxidación a compuestos biológicos que tienen una mayor importancia en ambientes ácidos como en la

membrana lipídica, tejido isquémico, etc. (Zentella y col., 1994).

La principal fuente de producción del H_2O_2 es la dismutación del O_2^- , reacción intracelular catalizada por la SOD. Esta molécula no es un RL pero es el principal precursor del OH. El H_2O_2 contiene electrones pares, y por lo tanto, no es un RL; sin embargo, constituye un oxidante estable que reacciona lentamente con la mayoría de las moléculas bio-orgánicas. El H_2O_2 es capaz de inactivar algunas enzimas, oxidando a los grupos sulfhidrilo. Al parecer, el H_2O_2 puede inactivar al DNA, inducir aberraciones cromosómicas. Este tipo de reacciones probablemente son mediadas por radicales secundarios generados desde H_2O_2 y por reacciones catalizadas por metales (Zentella y col., 1994).

Los radicales O_2^- y H_2O_2 , los cuales son especies reactivas poco dañinas celularmente, pueden, por otro lado, interactuar con ciertos metales de transición tales como el hierro o el cobre y/o quelados de bajo peso molecular para dar origen a una especie altamente reactiva como lo es OH (Reacción de Fenton):



En este tipo de reacción, el hierro actúa como catalizador reducido por O_2^- y entonces oxidado por H_2O_2 (Reacción de Haber-Weiss). Los compuestos conteniendo metales que han sido implicados como catalizadores biológicos son quelados de hierro de bajo peso molecular tales como ADP-Fe^{3+} , citrato-Fe^{3+} , etc (Zentella y col., 1994).

2.6. Sistemas de defensa antioxidante

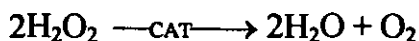
A pesar de que existe una alta concentración de moléculas oxidantes en el SNC, éste tiene diversos mecanismos dedicados a su reducción (Coyle y Puttfarcken, 1993). Las enzimas antioxidantes protegen al organismo contra los efectos del daño de los RL. Como parte de los más importantes miembros del sistema de defensa antioxidante se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

La SOD cataliza la formación de H_2O_2 a partir de radicales $O_2^{\cdot -}$:



También previene la formación de peroxinitrito por competencia del (NO^{\cdot}) con el $O_2^{\cdot -}$ (Hageman y col., 1992). Esta enzima es una de las más abundantes en el medio celular y posee dos isoformas fundamentales que son codificadas por 3 genes separados expresados en células eucarióticas: La SOD dependiente de cobre y zinc (SOD-Cu/Zn) se encuentra concentrada en el citosol celular, mientras que SOD dependiente de manganeso (SOD-Mn) se localiza en la matriz mitocondrial; una forma de SOD-Cu/Zn es expresada a bajos niveles en el plasma y fluidos extracelulares. Por su parte, la SOD-Mn se distribuye generalmente en astrogliya y neuronas. La SOD-Cu/Zn se encuentra tanto en astrogliya y neuronas como en microgliya. Las dos formas enzimáticas pueden ser inducidas por diversos fenómenos como son: aumento en la concentración de RL, estrés oxidativo, radiación, inflamación, hipoxia, isquemia, etc. (Noack y col., 1998).

Por otro lado, la CAT es la encargada de la detoxificación de H_2O_2 :



Los ensayos con CAT son generalmente realizados por la determinación tanto de H_2O_2 removido como por la producción de oxígeno por métodos fluorométricos o espectrofotométricos (Aebi, 1984).

El glutatión es un sistema de defensa que consiste de un gran número de enzimas y cofactores. Estos mismos se encuentran disponibles para neutralizar peróxidos en general:



La enzima más importante involucrada en esta secuencia es la GPx, la cual es dependiente de selenio y que se tratará más adelante. Los niveles de SOD, CAT y GPx en eritrocitos de humano fueron establecidos en $115 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ sangre, $511 \pm 85 \mu\text{g/ml}$ sangre y $0.70 \pm 18 \mu\text{Mol NADPH/min/ml}$ sangre, respectivamente (Hageman, 1992).

Además de los antioxidantes enzimáticos, existen grupos de compuestos no enzimáticos tales como tocoferoles (o vitamina E), ascorbato (o vitamina C), β -caroteno, urato y ésteres retinoniles. Los niveles normales de estos antioxidantes en la sangre se encuentran ilustrados en la tabla # 2:

Tabla # 2. Concentraciones de antioxidantes naturales en el plasma

Antioxidante	μM
Ascorbato	50 ± 20
Vitamina E	10 - 40
Glutación	11 ± 2
Urato	160 - 450
Carotenoides	2 ± 0.3

El papel de los antioxidantes en la protección contra el daño por radicales libres ha sido extensamente estudiado, revelando un sistema complejo de interacciones entre ellos mismos y la generación de algunos otros. Así, la vitamina E puede ser oxidada por O_2^- a vitamina E quinona, la cual puede ser regenerada por la vitamina C dehidroquinona. La vitamina C a la vez, puede ser regenerada por el sistema glutación/glutación reductasa que trae como efecto final una disminución en los niveles de NADPH (Hageman y col., 1992).

El ácido ascórbico (vitamina C) es un antioxidante hidrofílico, mientras que el α -tocoferol (vitamina E) es hidrofóbico y ambos se encuentran concentrados en las membranas lipídicas. El α -tocoferol puede reaccionar con oxígeno molecular e hidróxido de hidrógeno, lo cual habla de su habilidad para donar hidrógenos a radicales alcoxy y peróxidos previniendo la peroxidación lipídica (Coyle y Puttfarcken, 1993).

2.6.1. Glutatión reducido (GSH)

El glutatión es un tripéptido tiol presente en todas las células animales, es sintetizado dentro de muchas células a partir de sus aminoácidos constituyentes (glutamato, cisteína y glicina); este tipo de aminoácidos no esenciales pueden ser sintetizados dentro del cuerpo u obtenerse a través de la dieta. La Fig. 9 presenta algunas de las transformaciones metabólicas del glutatión (Meister, 1994). El metabolismo del glutatión (ciclo γ -glutamil) es iniciado extracelularmente por las reacciones de la γ -glutamil transpeptidasa y dipeptidasa; estas enzimas se encuentran ancladas en el lado externo de las membranas celulares. La transpeptidasa actúa sobre el glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión-S-conjugados. Las reacciones catalizadas por γ -glutamil transpeptidasa tienen lugar en la presencia de aminoácidos y dan la formación de γ -glutamil aminoácidos (Allison y Meister, 1981).

La cisteína es el aceptor de aminoácidos más activo del grupo γ -glutamil (Thompson y Meister, 1975), otros aminoácidos neutros tales como metionina y glutamina. Los γ -glutamil aminoácidos son transportados y llegan a ser sustratos de γ -glutamil ciclotransferasa, la cual convierte a los γ -glutamil aminoácidos a 5-oxoprolina y los correspondientes aminoácidos libres (Taniguchi y Meister, 1978). La 5-oxoprolina es convertida a glutamato en la reacción catalizada por 5-oxopronilasa (Seddon y Meister, 1986). Es notable que la γ -glutamil transpeptidasa esté localizada extracelularmente y sin embargo, el glutatión se encuentre dentro de las células. Muchas células normalmente exportan glutatión (Meister, 1994). Así, el glutatión exportado interactúa con cisteína y γ -glutamil transpeptidasa para producir γ -glutamil cisteína, la cual es transportada al interior celular. Altos niveles de glutatión extracelular inhiben tal transporte (Griffith y col., 1979).

El glutatión es exportado por el hígado al plasma sanguíneo y a la bilis. El GSH plasmático es usado en muchos tejidos, por ejemplo, riñón, pulmón y cerebro; por si mismo no se transporta significativamente dentro de la mayoría de las células de estos tejidos, pero es segmentado por las enzimas dipeptidasa y γ -glutamil transpeptidasa inmersas en la membrana celular; los productos de este rompimiento son transportados y utilizados para la síntesis del GSH (Meister, 1994). Por otro lado, se ha establecido que la mitocondria no posee las enzimas necesarias para la síntesis de GSH, por lo cual indica que el GSH mitocondrial se origina a partir del citosol (Griffith y Meister, 1985). El GSH

extramitocondrial proviene de la captura e intercambio y los espacios intermembranosos quizá funcionen como una zona de recuperación que facilita el eficiente circulamiento del GSH a la matriz (Meister, 1994). El eflujo de GSH a partir de la mitocondria es muy bajo cuando existen bajos niveles de GSH extramitocondrial, esto va acorde con un mecanismo que conserva el GSH mitocondrial durante periodos de depresión de GSH citosólico (Meister, 1994).

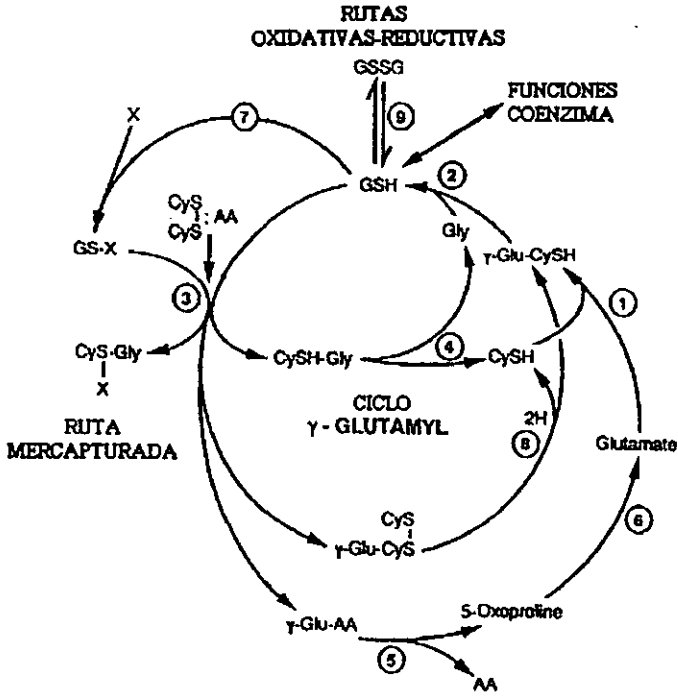


Fig. 9. Rutas metabólicas del glutatión (Meister, 1994).

El GSH es particularmente interesante con respecto a los receptores NMDA, ya que se encuentra constituido por aminoácidos en cercana relación con aquellos que participan en la activación de dichos receptores. La glicina por ejemplo, es conocida como un co-agonista para la activación de receptores NMDA por el glutamato (Reynolds y Miller, 1990). Así, es posible que el GSH extracelular, producto del intercambio entre los astrocitos y la neurona, pueda ayudar a regular la transmisión sináptica glutamatérgica, (Ogita y col., 1986). El GSH se encuentra asociado a diversas funciones vitales entre las que se incluyen la detoxificación

de xenobióticos vía conjugación enzimática, reducción de H_2O_2 y lípidicos y mantenimiento del estado tiol-disulfuro en las células (Kannan, 1992), así como también es conocido por su papel como el más abundante de los atrapadores de RL en el organismo. Se le encuentra en concentraciones de aproximadamente 1-2 mM en el cerebro, localizándose casi exclusivamente en células gliales, aunque puede llegar a existir en terminales nerviosas de neuronas y axones (Raps y col., 1989). Se han reportado concentraciones entre 8-20 mM en cultivos de astrocitos. Los niveles de GSSG han sido establecidos entre 1.2 % o menos del glutatión total. Así, el glutatión existe casi exclusivamente en forma reducida en el cerebro. Las implicaciones fisiológicas de estas observaciones fundamentan el que las neuronas poseen un bajo mecanismo de defensa antioxidante, el cual habla de su alta fragilidad ante una condición de estrés oxidante, contrario a lo que ocurre en las células gliales (Yudkoff y col., 1990).

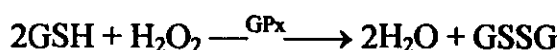
El sistema de transporte de GSH es mediado principalmente a través de acarreadores, los cuales son responsables de la extracción del GSH plasmático hacia la barrera hematoencefálica, encontrándose de una manera más activa en las ratas jóvenes o en desarrollo; sin embargo, existe evidencia sugiriendo que el transporte de GSH puede jugar un papel más importante que la γ -glutamil transpeptidasa en la extracción de GSH desde los capilares hacia el cerebro (Kannan, 1992). Condiciones neurológicas severas de daño tales como la isquemia focal, crisis y la enfermedad de Parkinson, se encuentran todas asociadas a una deficiencia de GSH cerebral (Perry y col., 1982). Defectos genéticos en la síntesis de GSH se encuentran ligados a retraso mental y secuelas neurológicas serias (Meister, 1994).

Por otro lado, tanto la forma GSH como la GSSG estimulan el flujo de calcio al interior celular de una manera dependiente a la concentración, en un rango fisiológico de entre 125 μ M y 8 mM, aunque el GSSG es significativamente más efectivo para estimular la entrada de calcio a las células. Así, en contraste a la reciente evidencia de que agentes que reducen los grupos sulfhidrilo (tales como el dithiotreitol) mejoran la activación de los receptores NMDA, se ha sugerido que los grupos cisteinil-SH del GSH pueden contribuir significativamente a la activación o modulación de los receptores NMDA. Similarmente, se ha reportado que concentraciones micromolares bajas de glutatión liberado de células gliales pueden servir para modular la interacción entre el glutamato y los receptores NMDA; en tales casos podría regular, modificar o prevenir respuestas al glutamato neuronal. Por su parte, concentraciones micromolares altas pueden activar a dichos receptores directamente e incrementar el flujo de calcio intracelular (Dildy-Mayfield y Leslie, 1991).

Por otro lado, la liberación de GSH es principalmente neural; sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que las neuronas sean capaces de liberar una sustancia que a su vez produzca la liberación de GSH a partir de células gliales. En este sentido, una elevación en el flujo de GSH ha sido observada a partir de células linfocíticas y monocíticas hepáticas inducidas hacia la apoptosis. Este tipo de flujo es atenuado por inhibidores del transporte de GSH, demostrando que tal extrusión ocurre vía activación de mecanismos de transporte específicos (Ghibelli y col., 1998).

2.6.2. Glutatión peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidasa (GPx) es una importante enzima dentro de los sistemas de defensa antioxidante. Como un componente del ciclo del GSH, ésta protege al hígado de los metabolitos reactivos del oxígeno, entre los que se encuentran hidroperóxidos, incluyendo aquellos derivados de ácidos grasos no saturados, ácidos nucleicos y otras biomoléculas importantes (Baker, 1993), por tanto, constituye una de las enzimas más importantes encargadas de la protección contra el daño oxidativo. A su vez, el GSH cataliza la reducción de H_2O_2 por la GPx:



Durante el ciclo, el GSH se regenera por la acción de glutatión reductasa (GSSGred)



La GPx es una enzima tetramérica soluble con una masa molecular de 85 kDa (cuando fue aislada a partir de bovinos) o 95 kDa (cuando se aisló de eritrocitos humanos). La M_r de los monómeros es de 19-22 kDa. Cada subunidad está constituida por un átomo de selenio en su estado reducido, incorporado dentro de un residuo de selenocisteína al sitio activo de la enzima. La presencia de selenio es necesaria para la actividad enzimática (Baker, 1993).

Se ha observado que la concentración de GPx más alta se encuentra principalmente en el hígado, aunque de igual manera puede ser observada bajo condiciones normales en el cerebro de ratas, en donde fundamentalmente se localiza en microglia, y en especial, en

ramificaciones, citoplasma y núcleo. En los humanos, la GPx se distribuye principalmente en neuronas y astrocitos. También se ha observado GPx en el cerebro infartado de humanos, en algunas células vecinas a las células dopaminérgicas, en el mesencéfalo de pacientes con la EP, etc. (Lindenau y col., 1998). Comúnmente se ha reportado que la administración de QUIN exhibe un incremento en la inmunoreactividad microglial así como también en astrocitos, predominando en el centro de la lesión neurotóxica y que contienen la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (Lindenau y col., 1998).

2.6.3. Glutatión reductasa (GSSGred)

La glutatión reductasa (GSSGred) es una flavoproteína, la cual cataliza la reducción de GSSG para dar origen a dos moléculas de GSH usando el alto poder reductante de NADPH (Grant y col., 1996). La glutatión reductasa participa en la prevención de la peroxidación de lípidos generada por ROS, los cuales inducen daño celular; por otro lado, se conoce que el peroxinitrito (ONOO⁻) es capaz de deprimir la actividad de GSSGred de una manera dependiente a la concentración con una aparente inhibición del 50%; por lo cual se sugiere que el GSH juega un papel muy importante en el mantenimiento de la actividad de GSSGred debido a que este último se encuentra participando en la inactivación de un gran número de especies oxidantes entre las cuales se encuentra el (ONOO⁻) (Barker y col., 1996).

2.7. Marcadores de estrés oxidativo

El cerebro es altamente susceptible al ataque por los RL debido a su alto contenido de lípidos insaturados y a su alta tasa de consumo de oxígeno. Por tal motivo, es común tener mecanismos de estrés oxidante producto de la excitotoxicidad generada a partir del ataque radical o del mal funcionamiento enzimático. Existen diversos marcadores de estrés oxidativo que nos pueden ser útiles para evidenciar algún tipo de mecanismo excitotóxico, entre algunos de ellos se encuentran: peroxidación de lípidos, alteración enzimática de los sistemas antioxidantes, alteración en los niveles de GSH, alteración en la morfología celular, etc.

Los niveles disminuidos de GSH o el incremento en los niveles de GSSG han sido sugeridos de manera separada como índices de daño por RL (Smith, 1991).

Desafortunadamente, el mayor problema al medir el contenido de GSSG celular radica en la alta tasa de auto-oxidación del GSH a GSSG. Generalmente, la determinación de GSSG es obtenida por medio de un procedimiento para atrapar GSH con un agente alquilante tiol, tal como la N-etilmaleimida, y subsecuentemente, por la conversión enzimática a GSSG por la GSSGred, midiendo el consumo de NADPH (Kretzschmar y col., 1991). Obviamente, la tasa GSH/GSSG juega un papel importante en la defensa contra el daño por RL. Sin embargo, los niveles de GSH representan un mejor marcador oxidativo, ya que éstos pueden ser afectados por más de una vía, siendo que el GSH está involucrado en diferentes sistemas de defensa antioxidante. Los factores que afectan los niveles de GSH/GSSG incluyen la actividad de la GPx y la GSSGred, el estado nutricional y la interacción proteína-proteína (Hageman, 1992).

En el presente trabajo se evaluó la alteración de diferentes marcadores de estrés oxidativo, debido a la administración intraestriatal de tres neurotoxinas como modelos de la EH, y así establecer patrones de toxicidad selectivos.

III. HIPOTESIS

- Siendo el QUIN, el KA y el 3-NPA promotores de la generación de radicales libres y de estrés oxidativo en cuerpo estriado de rata en experimentos *in vivo* por la mediación de procesos excitotóxicos producidos sobre los receptores glutamatérgicos, se espera que la actividad enzimática de la GPx incremente en relación directa con los tiempos de exposición aguda a las toxinas, poniendo de manifiesto la participación de un mecanismo de daño oxidativo, a través del cuál se producirá una disminución en los niveles estriatales de GSH.

IV. OBJETIVOS

- Medir la actividad enzimática de la GPx después de la administración intraestriatal de QUIN, KA y 3-NPA a diferentes tiempos posteriores a la lesión bajo un esquema agudo.
- Cuantificar los niveles estriatales de GSH en ratas lesionadas estriatalmente con las tres toxinas a diferentes tiempos como un marcador de daño oxidativo.

V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Animales

Para todos los ensayos se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de entre 250 y 300 g. Los animales se colocaron en cajas de acrílico (5 por caja) y fueron provistas con nutricubos de Chow Purina y agua *ad libitum* y mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, *Manuel Velasco Suárez*.

5.2. Reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas en agua desionizada (desionizador Milli R/Q de Millipore), en frío, empleando agitadores magnéticos y preservadas en refrigeración protegidas de la luz. El QUIN, el KA y el 3-NPA, así como otros reactivos, fueron todos obtenidos de conocidas marcas comerciales (Sigma, Merck, Aldrich, etc.).

Se prepararon soluciones de QUIN (240 nmol/ μ l), KA (7.5 nmol/ μ l) y 3-NPA (500 nmol/ μ l). Tanto el QUIN como el KA fueron disueltos en solución salina (0.9 % NaCl) y llevados a un pH de 7.4 con una solución de 0.1 N de NaOH. Por su parte, El 3-NPA se disolvió igualmente en solución salina 0.9 % pero se ajustó a un pH de 7.4 con una solución de carbonato de sodio 0.1 M. Esta misma solución de NaCl sirvió como control para la microinyección intraestriatal.

Para la evaluación de la actividad de GPx se prepararon soluciones frescas de fosfato de sodio (Na_2HPO_4 0.4 M, pH 7.0), azida de sodio (NaN_3 0.01 M), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 1.25 mM) y una solución de ácido metafosfórico conteniendo: ácido metafosfórico + EDTA 1M + NaCl 1M protegido de la luz. Todas las soluciones anteriores fueron disueltas en agua desionizada. Simultáneamente se preparó una solución de DTNB [5,5- Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)] (20 mg) disuelto en 50 ml de citrato de sodio al 1 % protegido de la luz. Por último, se preparó una solución stock de GSH 1 mg/ml de agua para la construcción de la curva de calibración.

Para el análisis del contenido de GSH/GSSG, se preparó una solución stock de GSH 1mg/ml de buffer de fosfato de sodio monobásico 0.1 M + EDTA 0.005 M pH 8.0. Posteriormente, se tomaron de estas últimas soluciones 20 μ l y se aforaron a 10 ml con buffer de fosfatos 0.1 M + EDTA 0.005 M para el GSH. También se prepararon soluciones de HPO₃ (25 %) y N-etilmaleimida (NEM 0.04 M), ambos disueltos en agua desionizada. De igual forma, se preparó una mezcla de OPT + metanol (1:1, v/v). Todas las soluciones anteriores se prepararon "en fresco".

Los reactivos para la determinación de proteínas por el método de Lowry (1951) fueron: a) solución de albúmina de Suero Bovino (250 μ g/ml); b) mezcla "en fresco" de: 49 ml de Na₂CO₃ al 2 % en NaOH 0.1 N + 0.5 ml de tartrato de Na⁺ y K⁺ al 2 % en agua + 0.5 ml de CuSO₄ al 1 % en agua; y c) reactivo de folín-fenol diluido en proporción 1:1 (v/v) y preparado "en fresco".

5.3. Métodos

5.3.1. Microinyección estereotáxica

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) antes de la administración intraestriatal. Se realizaron inyecciones unilaterales de 1 μ l de QUIN, KA o 3-NPA con microjeringa Hamilton de 10 μ l en el estriado derecho de cada rata a las siguientes coordenadas estereotáxicas: + 0.5 mm anterior a bregma, - 2.6 mm lateral a bregma y - 4.5 ventral a la dura, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1984). Las toxinas se inyectaron por un período de 2 minutos. Los animales control fueron inyectados con el mismo volumen de NaCl 0.9%.

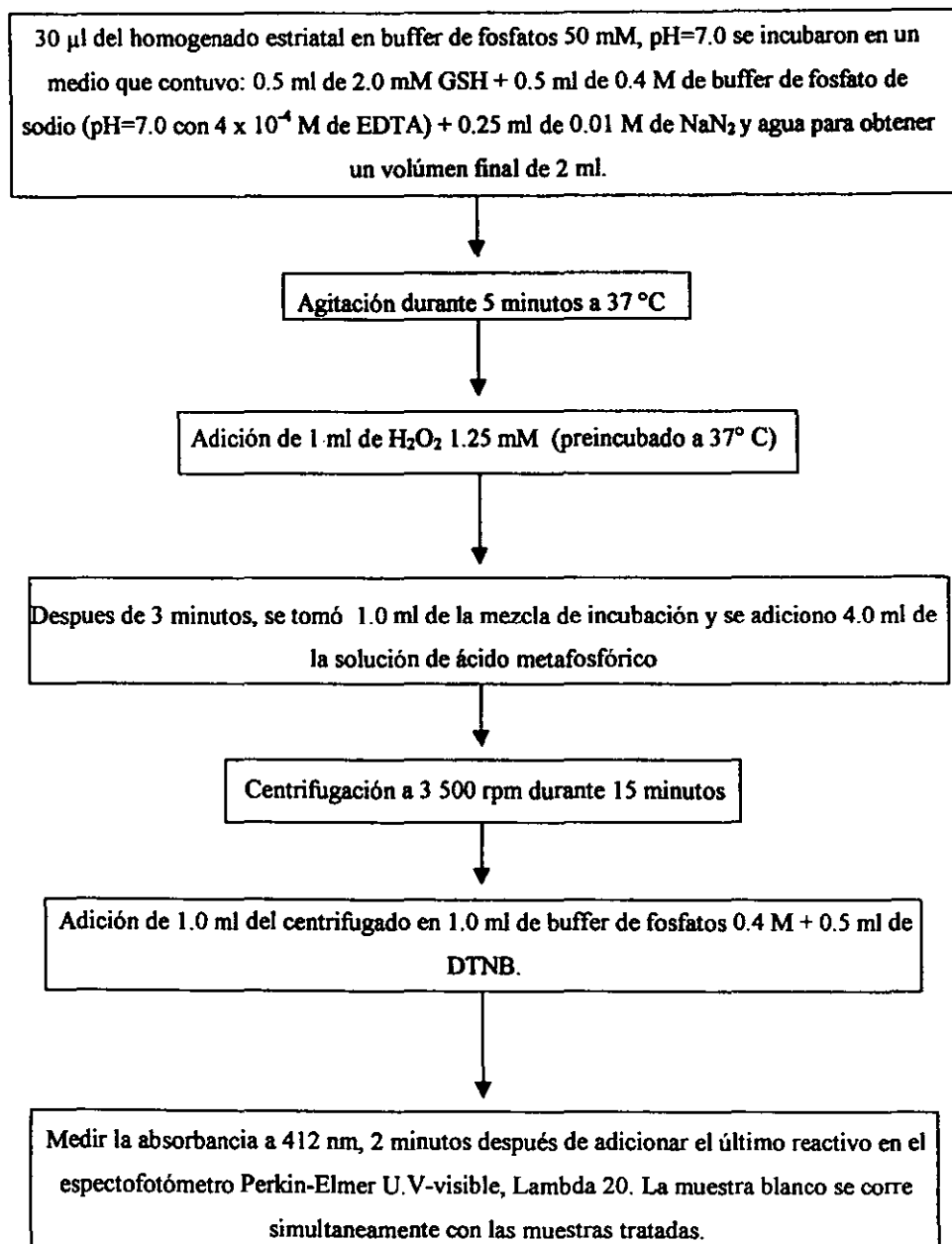
Dos hrs. después de la administración de QUIN a diez ratas, tres y seis hrs. después de administrar KA y 3-NPA a seis ratas, los estriados se disecaron rápidamente y se homogenaron en 9.0 ml de una solución buffer de fosfatos (pH 7.4) y preservados en frío (-5 °C) hasta su procesamiento para la determinación de la actividad enzimática de GPx y el contenido de GSH.

5.3.2. Análisis de la actividad de la GPx

Para la determinación de la actividad enzimática de la GPx se empleó la técnica de Mills (1957). Treinta μl de los homogenados de estriado en buffer de fosfatos fueron incubados en el siguiente medio: 0.5 ml de 2.0 mM GSH + 0.5 ml de 0.40 M de buffer de fosfato de sodio (pH 7.0 con 4×10^{-4} M de EDTA) + 0.25 ml de 0.01 M de NaN_2 en agua para obtener un volumen final de 2.0 ml. Después de 5 minutos en agitación a 37°C , 1.0 ml de 1.25 mM de H_2O_2 (preincubado a 37°C) fue adicionado. Pasando 3 minutos, una alícuota de 1.0 ml de la mezcla de incubación fue removida y adicionada a 4.0 ml con una solución de ácido metafosfórico (1.67 gr de ácido metafosfórico glacial + 0.2 gr de EDTA + 30 gr de NaCl). Posteriormente, se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos; el GSH libre de proteínas fue determinado usando una mezcla que contuvo 1.0 ml del centrifugado en 1.0 ml de buffer de fosfatos 0.4 M + 0.5 ml de DTNB. Se midió la absorbancia a 412 nm 2 min después de adicionar el último reactivo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer U.V-visible, mod. Lambda 20. La muestra blanco (con H_2O) fue corrida simultáneamente con las muestras tratadas, deteniendo la reacción de oxidación no enzimática del GSH por H_2O_2 ocurrida durante la incubación.

Para obtener la actividad de GPx se construyó una curva de calibración de la siguiente manera: Se consideraron cuatro puntos que contenían: a) 2.0 ml de buffer de fosfatos + EDTA pH 7.0 + 0.5 ml de DTNB; b) 1.4975 ml de buffer de fosfatos + EDTA 1M + 2.5 μl de GSH + 0.5 ml de DTNB; c) 1.475 ml de buffer de fosfatos + EDTA 1M + 25 μl de GSH + 0.5 ml de DTNB y d) 1.25 ml de buffer de fosfatos + EDTA 1M + 250 μl de GSH + 0.5 ml de DTNB. Todos los cuatro puntos contenían un volumen final de 2.5 ml. Por último, se registró la absorbancia a 412 nm, dos minutos después de adicionar el último reactivo, en un espectrofotómetro Perkin-Elmer U.V.-visible, mod. Lambda 20. (Ver figura 10).

Fig.10. Analisis de la actividad GPx

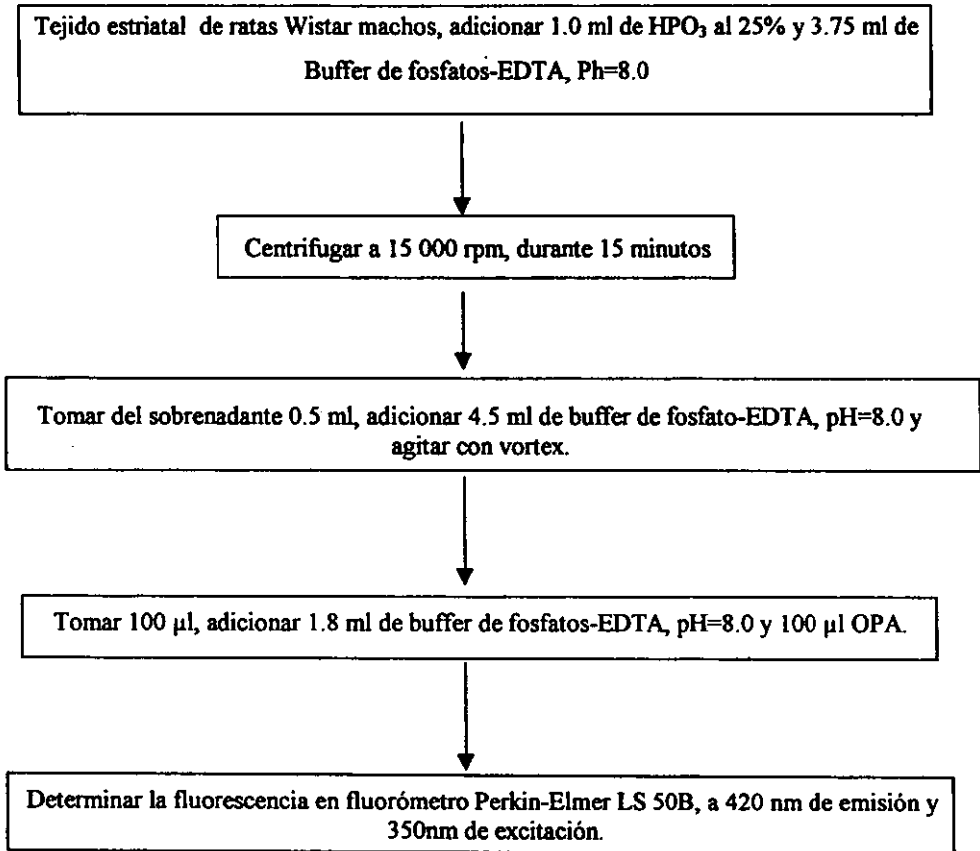


5.3.3. Análisis del contenido de Glutati6n reducido (GSH)

Para la determinaci6n del contenido estriatal de GSH, se emple6 la t6cnica de Hissin y Hilf (1976). Una vez realizada la inyecci6n estereot6xica de QUIN, KA o 3-NPA y transcurrido un tiempo de 2, 3 o 6 horas, se obtuvieron los estriados de las ratas y se homogenizaron en un vol6men de 3.75 ml de buffer de fosfatos pH 8.0 con EDTA 0.005 M + 1.0 ml de HPO_3 al 25 %, se tomaron 0.5 ml para la determinaci6n de prote6nas; el vol6men restante se centrifug6 a 15,000 rpm durante un periodo de 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron 0.5 ml para determinar la concentraci6n de GSH, como se describe a continuaci6n: Se tomaron 0.5 ml + 4.5 ml de buffer de fosfatos pH 8.0 y posteriormente se agitaron con vortex. Se obtuvo una alicuota de 100 μl de la mezcla anterior y se mezcl6 nuevamente con 1.8 ml de buffer de fosfatos pH 8.0 + 100 μl de la mezcla OPT-metanol (1:1, v/v). Se adicionaron 200 μl de N-etilmaleimida (0.04 M) para inhibir la oxidaci6n de GSH a GSSG. Se incubaron las alicuotas a temperatura ambiente por 15 minutos y protegidas de la luz, por 6ltimo se determin6 la se6al de luminiscencia a 420 nm de emisi6n y 350 nm de excitaci6n, en un fluor6metro Perkin-Elmer mod. LS 50B. (Ver figura 11).

Finalmente, se construyeron curvas de calibraci6n para GSH de la siguiente manera: De una soluci6n stock conteniendo 1 mg de GSH/ml de buffer, se tomaron 200 μl y se aforaron a 10 ml con buffer de fosfatos pH 8.0 (conteniendo EDTA 0.005 M). De esta 6ltima soluci6n se tomaron 250 μl , 500 μl , 1000 μl y 1500 μl y se aforaron cada una a 10 ml con buffer de fosfatos + EDTA 0.005 M. De cada uno de estos puntos se tomaron entonces 100 μl y se adicionaron con 1800 μl de buffer de fosfatos + EDTA 0.005 M + 100 μl de la mezcla OPT-metanol (1:1, v/v), dej6ndose reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y protegidas de la luz. Para obtener el punto blanco se adicionaron 1900 μl de buffer + 100 μl de la mezcla OPT-metanol (1:1, v/v) 6nicamente. Posteriormente, se determin6 la se6al de luminiscencia bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Fig. 11. Analisis del contenido de GSH



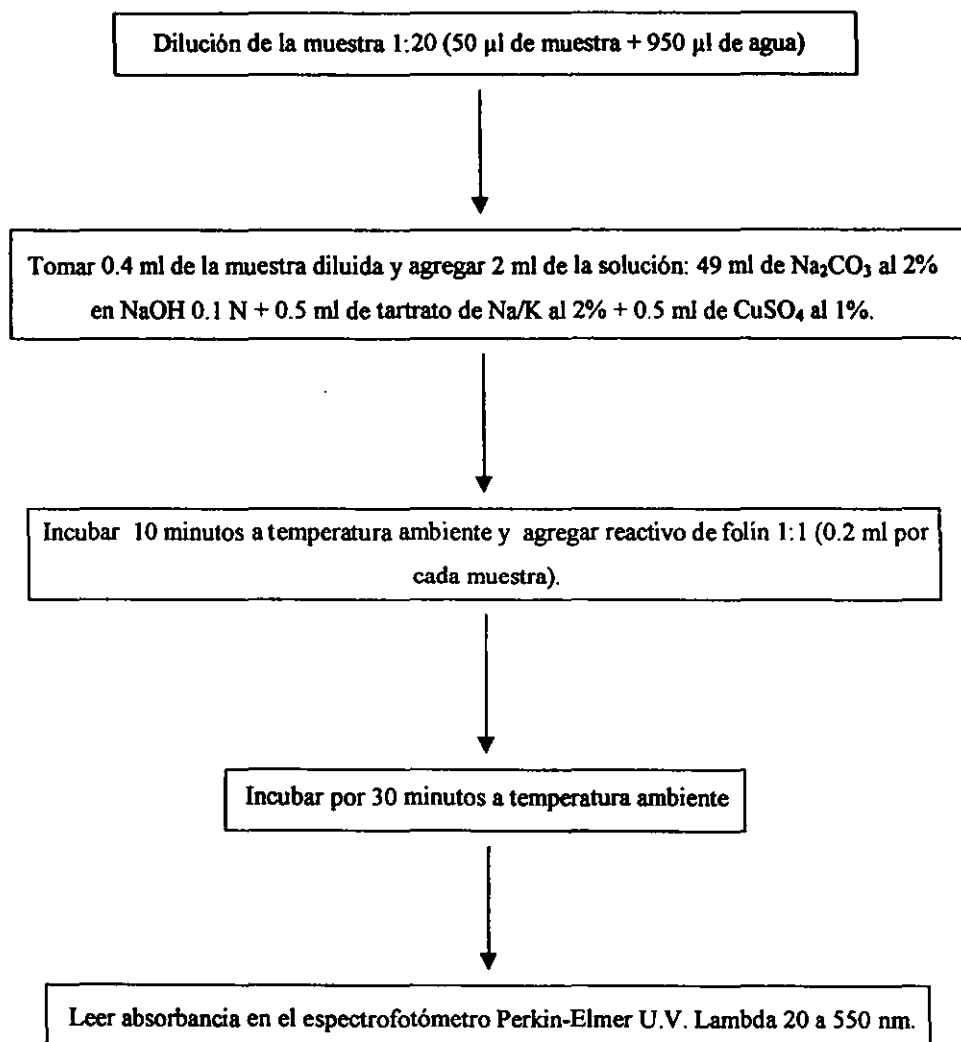
5.3.4. Determinación de proteínas por el método de Lowry

Todas las muestras se analizaron de acuerdo al método de Lowry y col. (1951) para determinar su contenido de proteínas. Se diluyó cada muestra en proporción 1:20 (50 μ l de muestra + 950 μ l de agua), se pipetearon 0.4 ml de la muestra diluida y se agregaron 2 ml de la siguiente solución: 49 ml de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N + 0.5 ml de tartrato de Na/K al 2 % + 0.5 ml de CuSO_4 al 1 %. A los 10 minutos, se agregó el reactivo de folin-fenol 1:1 (0.2 ml por cada muestra) y se leyó la absorbancia después de 30 minutos en el espectrofotómetro Perkin-Elmer U.V.-visible a 550 nm, Lambda 20. (Ver figura 12).

5.3.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se considero a los tratamientos para estadística paramétrica comparativa, por lo que para los tratamientos con sólo dos grupos se aplicó la prueba "T" de Student para comparación de medias. Por otro lado, para los tratamientos con tres grupos se aplicó análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey para comparación de medias.

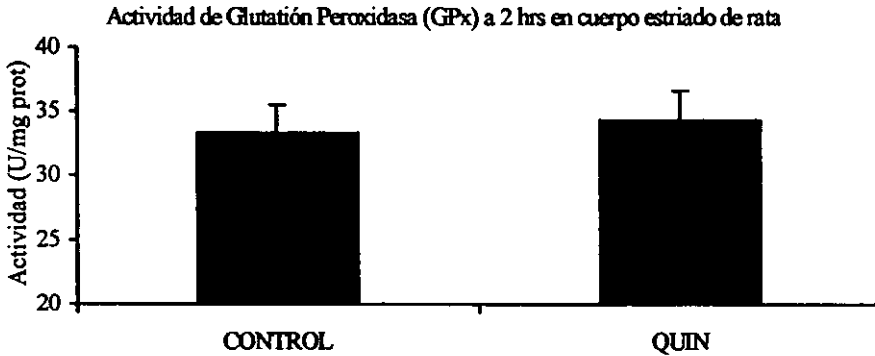
Fig. 12. Determinación de proteínas por el método de Lowry



VI. RESULTADOS

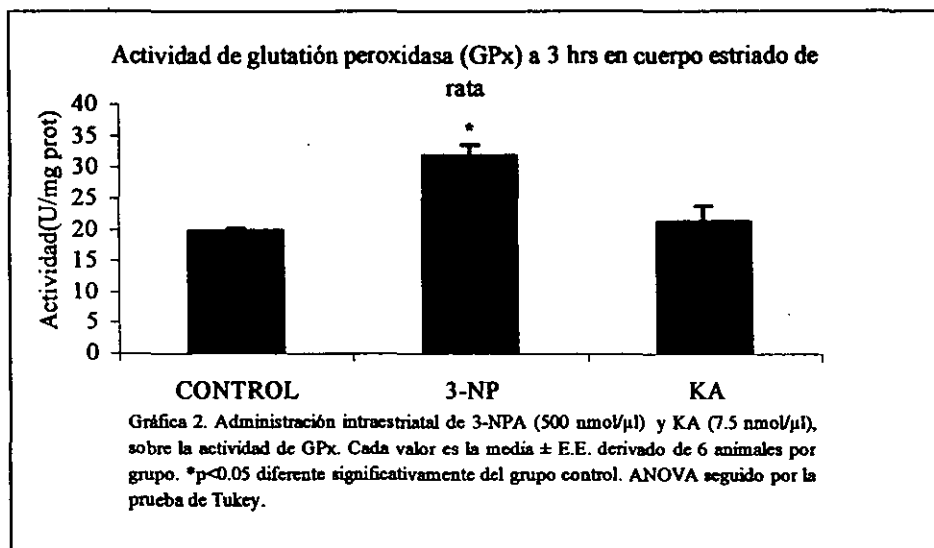
6.1. Efecto de la administración intraestriatal de QUIN, 3-NPA y KA sobre la actividad de la GPx

En la Gráfica 1 se presenta la actividad enzimática de la GPx (U/mg prot) 2 hrs. después de haberse administrado intraestriatalmente el QUIN. Debe observarse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el lote control y el tratado con la toxina.

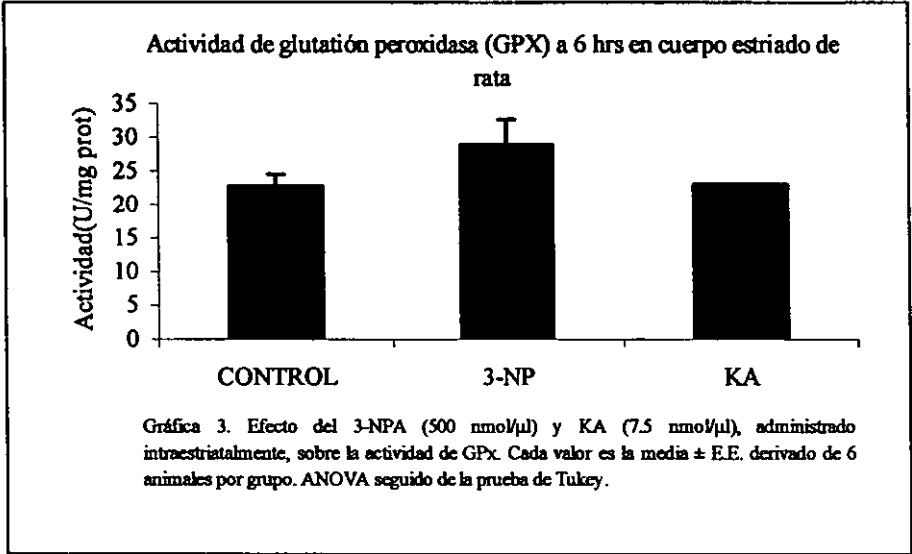


Gráfica 1. Efecto del QUIN (240 nmol/ μ l) administrado intraestriatalmente, sobre la actividad de la GPx en ratas. Cada valor es la media \pm E.E. derivado de 10 animales por grupo. Prueba "t" de Student.

En la Gráfica 2 se muestra la actividad estriatal de la GPx 3 hrs posteriores a la administración de las toxinas (3-NPA y KA). Puede observarse que existe una diferencia estadísticamente significativa, después de aplicar ANOVA seguido por la prueba de Tukey, que corresponde al 3-NPA vs control. El ácido kaínico no presentó éste comportamiento.

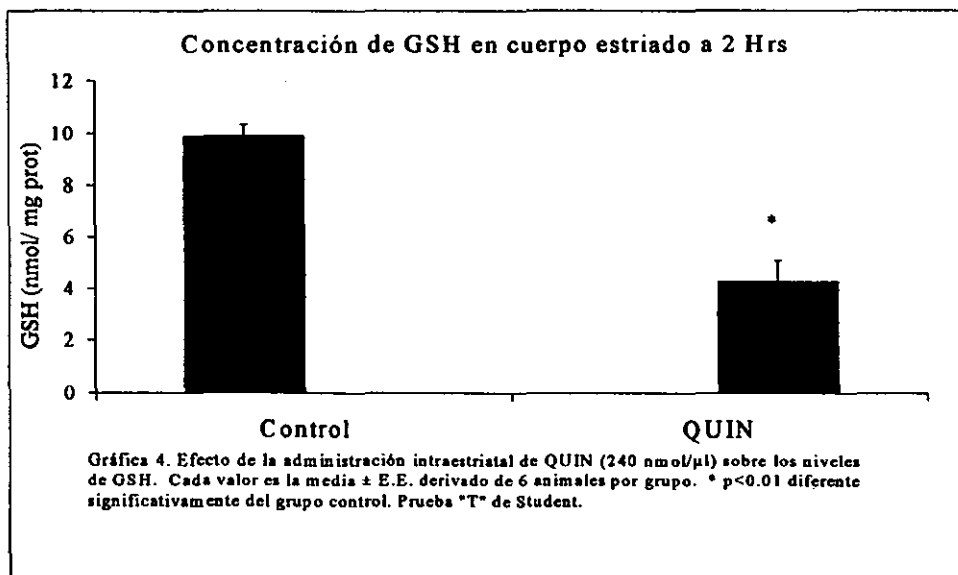


En la Gráfica 3 se presenta la actividad de la GPx 6 hrs después de administrar las toxinas 3-NPA y KA, intraestriatalmente. No existen diferencias estadísticamente significativas en ambos tratamientos vs control, después de aplicar ANOVA seguido por la prueba de Tukey.

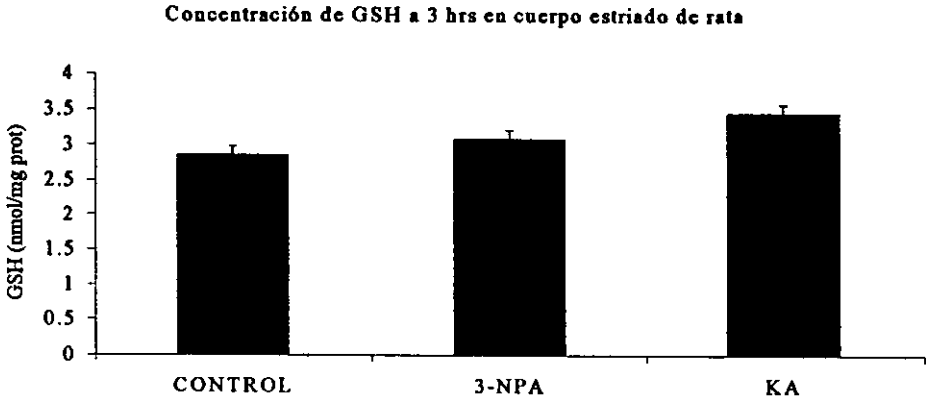


6.2 - Efecto de la administración intraestriatal de QUIN, 3-NPA y KA sobre los niveles de glutatión reducido (GSH).

En la Gráfica 4 se presenta la concentración estriatal de GSH (nmol/mg prot) 2 horas después de la administración intraestriatal de QUIN (240 nmol/ μ l). Existen diferencias estadísticamente significativas después de aplicar la prueba "T" de Student.

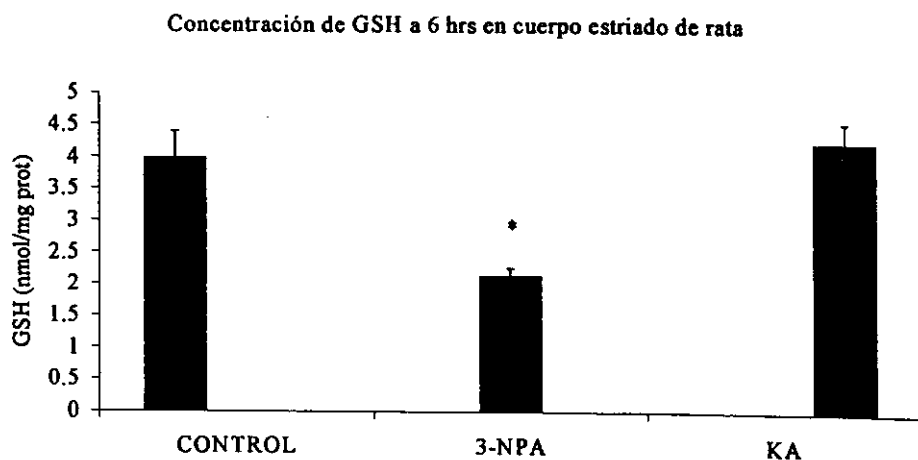


En la Gráfica 5 se presentan los niveles de GSH (nmol/mg prot) 3 horas después de la administración intraestriatal de 3-NPA y KA. Puede observarse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos con respecto al control, después de aplicar ANOVA seguida de prueba de Tukey.



Gráfica 5. Efecto de la administración intraestriatal de 3-NPA (500 nmol/ μ l) y KA (7.5 nmol/ μ l) sobre los niveles de GSH. Cada valor es la media \pm E.E. de 6 animales por grupo. ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

En la Gráfica 6 se presentan los niveles de GSH (nmol/mg prot), 6 horas después de la administración de 3-NPA y KA. Puede observarse que sólo existe una diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento con 3-NPA producto del daño estriatal exhibido por la tóxina, después de aplicar ANOVA seguido de la prueba de Tukey.



Gráfica 6. Efecto de la administración intraestriatal de 3-NPA (500 nmol/ μ l) y KA (7.5 nmol/ μ l) sobre la concentración de GSH. Cada valor es la media \pm E.E. derivado de 5 animales por grupo. * p < 0.01 diferente significativamente del grupo control. ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

VII. DISCUSION

En este trabajo se encontró que las excitotoxinas (QUIN y 3-NPA) empleadas como modelos experimentales de EH expresan un patrón de daño metabólico específico que puede evidenciarse por el incremento en la actividad enzimática de GPx 3 hrs post-administración del 3-NPA (Gráfica 2); asimismo, se presentó una disminución en los niveles estriatales de GSH, 2 hrs después de la administración de QUIN (Gráfica 4) y 6 hrs posteriores a la administración de 3-NPA (Gráfica 6); sin embargo, el daño excitotóxico que ejerce el KA permanece aún incierto, ya que no es posible explicarlo a partir de los resultados obtenidos. Así, la acción de estas toxinas genera diferentes rutas excitotóxicas que están relacionadas con la alteración enzimática y no enzimática observada en este estudio.

Existen reportes que han servido para explicar parcialmente las propiedades excitotóxicas del QUIN y especular acerca de su participación en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas (Schwarcz, 1984). Se ha propuesto que el mecanismo por medio del cual el QUIN ejerce sus efectos tóxicos en SNC involucra la activación de los receptores para NMDA y un consecuente incremento en la permeabilidad para iones calcio y sodio por la apertura masiva de canales membranales aumentando la concentración citoplasmática del ion calcio. Por otro lado, es bien conocido que existen mecanismos antioxidantes en el interior celular que se encargan de proteger a la célula del estrés oxidativo; entre algunos de estos mecanismos se encuentran: la glutatión peroxidasa (GPx); los resultados obtenidos en este estudio, en donde no se detectaron cambios en la actividad de la GPx por el efecto del QUIN (Gráfica 1), sugieren que el daño oxidativo generado por esta toxina en relación al ciclo del glutatión no se debe a un proceso enzimático vinculado a la GPx, sino posiblemente a la alteración directa del balance de glutatión oxidado/reducido (GSH/GSSG) (Gráfica 4), con una consecuente inactivación del GSH por reacción directa con radicales libres; la generación de radicales libres se relaciona con el tiempo de exposición a la toxina empleado en este estudio, ya que pasando las 2 hrs de exposición a la misma, la peroxidación de lípidos membranales disminuye (Santamaría y Ríos, 1993; Ríos y Santamaría, 1991). Adicionalmente, es bien sabido que la ruta de síntesis del QUIN es esencialmente glial y que el GSH se encuentra localizado principalmente en glia, por lo que este tipo de células son las encargadas de proteger a las neuronas mediante la liberación del

mismo (Leslie y col., 1991). Múltiples experimentos han demostrado la habilidad del GSH y del GSSG para interactuar con un sitio redox modulador del receptor NMDA, y de esta manera modular su actividad por intervenir directamente en la permeabilidad al calcio (Leslie y col., 1991). Así, es posible que la reducción en los niveles de glutatión de nuestros resultados (Gráfica 4), pueda deberse también a que la síntesis de este último se esté viendo afectada debido a la interacción del QUIN con las células gliales, que aunque en condiciones normales no ocurre a grados mayores, en condiciones de estrés oxidativo bien podría generar una alteración en el sistema astrogial que sea responsable de reducir los niveles de GSH intrastriatales, ya que la glia constituye aproximadamente el 30 % del volumen del cerebro.

Por su parte, la aplicación intraestriatal de KA a ratas reproduce algunas características exhibidas en pacientes con EH. Nuestros resultados indican que la actividad enzimática de GPx 3 y 6 hrs después de administrar la toxina no presentan cambios significativos (Gráficas 2 y 3), por lo cual, se sugiere que esta toxina requiere de un tiempo mayor para alterar este marcador, ya que esta última actúa sobre canales glutamatérgicos ionotrópicos sensibles a voltaje (receptores a kainato) y por reclutamiento de eventos puede lograr la apertura de canales NMDA sensibles a voltaje; en este sentido, se ha reportado que el daño neuronal generado por KA *in vivo* puede ser causado por la liberación de glutamato presináptico, el cual a su vez puede activar a los receptores postsinápticos de tipo NMDA, incrementando las concentraciones de calcio intracelular y la liberación del mismo a partir de pozas intracelulares (Berg y col., 1995). Así, es posible que la actividad enzimática de GPx en respuesta al daño excitotóxico del KA requiera de una secuencia de eventos a expresarse en tiempos superiores a los analizados en este estudio (Gráficas 2 y 3). Por otro lado, la concentración de GSH en ratas, 3 y 6 hrs posteriores a la administración de KA no presentó cambios significativos (Gráficas 5 y 6), lo cual sugiere que este tipo de daño neurotóxico no se encuentra relacionado con la vía enzimática de GPx ni a la alteración del balance de GSH:GSSG. Esto significa que a pesar de que pudiera existir generación de radicales libres producto del daño neurotóxico del KA, el tiempo requerido para su generación sea superior al examinado: o bien, que los radicales libres generados no sean sustratos para dichos mecanismos antioxidantes. Así, podemos decir que en nuestro trabajo no existe un

mecanismo específico que defina la acción oxidativa del KA, a pesar de las diferentes rutas de daño que pudieran estar siendo activadas por su administración aguda.

Por otro lado, la administración sistémica de 3-NPA a roedores trae como resultado una progresiva degeneración en el sistema locomotor parecida a la que se observa en pacientes con EH (Borlongan y col., 1996). Por su parte, la mitocondria constituye el mayor reservorio fisiológico de especies reactivas del oxígeno (ROS), debido a que el bloqueo selectivo de la misma nos genera la formación de O_2^- y H_2O_2 , siendo estas últimas capaces de atacar las membranas mitocondriales y combinarse con otro tipo de RL para formar especies mucho más tóxicas, como es el caso del OH^\cdot y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Fig. 8); también se sabe que una importante fracción del oxígeno utilizado por la mitocondria (cerca de 2-5%) es convertido, aparentemente a través de la SOD-Mn, a H_2O_2 . Al parecer la GPx es la única enzima antioxidante que es capaz de reducir los H_2O_2 producidos por la SOD-Mn en la mitocondria. La administración intraestriatal de la toxina presenta sus máximos efectos después de 3 horas, ya que pasando este periodo de tiempo la toxina experimenta una reducción en su actividad; por el contrario, antes de las 3 horas post-inyección, los efectos neurotóxicos del 3-NPA no son tan evidentes. Por consiguiente, el aumento en la actividad enzimática de GPx encontrado en nuestros resultados (Gráfica 2) sugiere la participación de esta última en la reducción de los niveles de H_2O_2 , producto del desequilibrio metabólico a partir de la administración intraestriatal de 3-NPA durante las primeras 3 horas post-inyección, ya que a 6 hrs la actividad enzimática no presenta diferencias significativas respecto a valores control (Gráfica 3). Este tipo de incremento en la actividad enzimática de la GPx se encuentra en relación directa con la localización de la enzima dentro de la célula, ya que esta última se encuentra distribuida en el citoplasma de las células neurales, por lo cual es capaz de hacer frente a los cambios bioquímicos inducidos por el 3-NPA, aunque también se puede encontrar en mitocondria en menor escala; con lo cual podríamos estar asociando este tipo de mecanismo como una defensa contra la muerte apoptótica mediada a partir del daño mitocondrial por radicales libres semejantes a H_2O_2 y radicales hidroxilo (OH^\cdot). Bogdanov y col. (1998) han reportado que existe un incremento en la generación de OH^\cdot *in vivo*, así como también un aumento en la vulnerabilidad a lesiones estriatales, siguiendo la administración de 3-NPA. Este tipo de

aumento en la concentración de OH^\cdot nos puede llevar a sugerir que existe un incremento en la generación de H_2O_2 que en última instancia puede dar origen a OH^\cdot mediante su ruptura homolítica; o bien, que el H_2O_2 pueda llegar a difundirse hasta cruzar la membrana mitocondrial interna y reaccionar con la ubisemiquinona para formar el radical OH^\cdot . Este último reacciona con las membranas fosfolípicas induciendo disminución en la actividad de citocromo oxidasa, y destabilización de ubisemiquinona; ambos eventos incrementan la tasa de liberación de ROS (Benzi y col., 1991); por consiguiente, es posible que la actividad enzimática de GPx sea insuficiente para controlar la producción de H_2O_2 y llegar a frenar la lesión estriatal a este tiempo. Otros estudios han revelado que una inhibición en el metabolismo energético mitocondrial induce un incremento en el flujo de GSH desde las neuronas, el cual sugiere ser causa potencial para una pérdida de ATP y falla en el mantenimiento de los gradientes iónicos (Zeevalk y col., 1998). De acuerdo a nuestros resultados, las concentraciones de GSH en el estriado de ratas administradas con 3-NPA a 3 hrs después de su administración, indican que este marcador no se encuentra alterado significativamente (Gráfica 5), lo cual nos lleva a suponer que la enzima GPx se encuentra haciendo frente al estrés oxidativo producido por la toxina (Gráfica 2) y que probablemente de haber existido disminución de GSH, ésta fue transitoria y atenuada por la acción antioxidante de la GPx a este tiempo. También podemos proponer que el estrés oxidativo mitocondrial producido por la administración intraestriatal de 3-NPA genera especies tóxicas, tales como H_2O_2 , OH^\cdot y $\text{O}_2^{\cdot-}$, que son capaces de incrementar la actividad enzimática de GPx; por consiguiente, este tipo de mecanismo antioxidante ocurre a través de una vía totalmente enzimática. Por otro lado, como ya hemos discutido anteriormente, a las 6 horas después del tratamiento no se observan cambios significativos en la actividad enzimática de GPx (Gráfica 3); sin embargo, los niveles estriatales de GSH presentan una drástica disminución (Gráfica 6), esto nos lleva a suponer que para este tiempo, se trata de un mecanismo de características no enzimáticas que justifican ambos cambios y que se reflejan en los niveles de GSH (Fig. 6), siendo que el potencial de daño oxidativo del 3-NPA ha sobrepasado ya la capacidad de respuesta atenuadora de la GPx (Gráfica 3), induciendo daño incluso a nivel enzimático. De la misma forma, la generación de H_2O_2 , formado a partir del efecto de 3-NPA, es capaz de formar otro tipo de radicales tales como los relacionados

con nitrógeno (nitratos, nitritos, etc) que son capaces de ejercer daño inclusive al DNA nuclear o mitocondrial. Es bien sabido que la mitocondria carece de enzimas para sintetizar GSH y por lo tanto se requiere que éste sea transportado a partir del citosol (Griffith y Meister, 1985). Estudios sobre mitocondrias de hígado de rata indican que la homeostasis de GSH mitocondrial es regulada por un sistema de transporte multicomponente el cual quizá explique la habilidad de la mitocondria para capturar y retener el GSH (Martansson y col., 1990); así, podríamos llegar a especular que el 3-NPA afecte alguna vía de este tipo de transporte y como consecuencia, exista una disminución en los niveles de GSH mitocondrial; o mas aún, puede que el 3-NPA sea tan específico que esté afectando la acción de la enzima γ -glutamylcistein-sintetasa, enzima que constituye el paso limitante en la síntesis de GSH u otro tipo de enzimas involucradas en el ciclo γ -glutamil.

Todos estos eventos juntos constituyen el marco de procesos que pueden estar involucrados en el patrón de daño oxidativo específico de cada toxina. Se requieren, en consecuencia, estudios más detallados para elucidar la participación específica de cada uno de ellos en cada modelo.

VIII. CONCLUSIONES

- La actividad enzimática de GPx 2 hrs después de la administración intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN), no presentó cambios significativos; sin embargo, los niveles estriatales de GSH disminuyeron, lo que sugiere que el daño excitotóxico ejercido por QUIN no está vinculado a un proceso enzimático.
- La acción neurotóxica producto de la administración aguda de ácido kaínico (KA) a 3 y 6 hrs, sigue una ruta de daño inespecífico que no involucra la alteración de la actividad enzimática de GPx ni de los niveles de GSH estriatal, a pesar de que los radicales libres generados por KA son sustratos para dichos antioxidantes, por lo que se sugiere que los tiempos de exposición del tejido al KA fueron insuficientes para observar alteraciones en los marcadores evaluados.
- El ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) generó un aumento en la actividad enzimática de GPx 3 hrs después de la inyección intraestriatal, por lo cual, dicho mecanismo neurotóxico es mediado enzimáticamente, evidenciado por la disminución en los niveles estriatales de GSH a las 6 hrs.
- A partir de nuestros hallazgos, se postulan mecanismos de daño oxidativo selectivos de cada toxina que son regulados por eventos específicos de cada modelo, entre los cuales se encontró que el 3-NPA es la excitotoxina que exhibe mayor potencia en la alteración de los marcadores de estrés oxidativo empleados en este estudio (GPx y GSH).

IX. REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Allison, R. D y Meister, A. (1981). Evidence that transpeptidation is a significant function of γ -glutamyl transpeptidase. *J. Biol. Chem.* 256: 2988-2992.
- Alston, T.A., Mela, L y Bright, H.J. (1977). 3-nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate deshidrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 3767-3771.
- Aquilonius, S.M y Sjostrom, R. (1971). Cholinergic and dopaminergic mechanisms in Huntington 's chorea. *Life. Sci.* 10: 405-414.
- Arzberger, T., Krampfi, K., Leimgruber, S y col. (1997). Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) RNAm expression in Huntington 's disease. An *in situ* Hybridization study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56: 446-454.
- Ashizawa, T., Wong, L.J.C., Richards, C.S., y col. (1994). CAG repeat size and clinical presentation in Huntington 's disease. *Neurology.* 44: 1137-1143.
- Baker R. (1993). Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep 3B. *Biochim. Biophys. Acta.* 304: 53-57.
- Barker, J.E., Heales, S.J., Cassidy, A y col. (1996). Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res.* 716: 118-122.
- Beal, F.M., Kowall, N.W., Ellison, D.W y col. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington 's disease by quinolinic acid. *Nature (letter).* 321: 168-171.
- Beal, M.F., Kowall, N.W., Swartz, K.J y col. (1989). Differential sparing of somatostatin-neuropeptide Y and cholinergic neurons following striatal excitotoxin lesions. *Synapse* 31: 38-47.
- Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G y col. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *The Journal of Neuroscience.* 13 (10): 4181-4192.
- Beal, M. (1993). Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J. Neurochem.* 61: 1147-1150.
- Ben- Ari, Y., Tremblay, E., Ottersen, O.P y col. (1980). The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain. Res.* 191: 79-97
- Benzi, G., Curti, D., Marzatico, F y col. (1991). Age-related acute depletion of cerebral glutathione by peroxidative stress. *Journal of Neuroscience.* 29: 527-532.
- Berg, M., Bruhn, T., Frandsen, A y col. (1995). Kainic Acid-induced seizures and brain damage in the rat: role of calcium homeostasis. *J. Neuros. Res.* 40: 641-646.
- Bird, E.D. (1980). Chemical pathology in Huntington 's disease. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 533-551.
- Bird, E.D. and Iversen, L.L. (1974). Huntington 's chorea: Postmortem measurement of glutamic acid-decarboxylase, choline acetyltransferase and dopamine in basal ganglia. *Brain.* 97: 457-472.

- Bogdanov, B.M., Ferrante, J.R., Kuemmerle, S y col. (1998). Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington ' s disease. *J. Neurochem.* 71: 2642-2644.
- Bondarref, W. (1986). Neurophatology of nucleus basalis and locus ceruleus in Alzheimer ' s disease. Biological substrates of Alzheimer disease. A.B. Scheibel and A.F. Wechsler (eds). Academic Press Inc. Orlando, 101- 103..
- Borlongan, C.V., Koutouzis, T.R., Freeman, T.B y col. (1996). Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3 - nitropropionic acid mimics the mitotic symptoms of Huntington ' s disease. *Brain Res.* 697: 251-257.
- Brouillet, E., Hantraye, P., ferrante, R,J y col. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7105-7109.
- Bruyn, R.P.M y Stoof, J.C. (1990). The quinolinic acid hypothesis in Huntington ' s chorea. *J. Neurol. Sci.* 95: 29-38.
- Carrasco, L.H y Mukherjiu, C.S. (1986). Atrophy of corpus striatum in normal male at risk of Huntington ' s chorea. *Lancet (letter).* 1: 1388-1389.
- Chase, T.N. (1973). Biochemical ans pharmacological studies of monoamines in Huntington ' s chorea. In: Barbeau, A., Chase, T.N and Paulson, G.W. (eds): *Advances in Neurology.* Vol 1. New York. Raven Press. 533-542.
- Chen, L y Mae Huang, L. (1992). Protein kinase C reduces Mg²⁺ block ofNMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature.* 356: 521-523.
- Coles, C.J., Edmondson, D.E y Singer, T.P. (1979). Inactivation of succinate deshydrogenase by 3-nitropropionate. *J. biol. Chem.* 254: 5161-5167.
- Conn, E. E. (1988). Biosynthetic relationship among cyanogenic glycosides, glucosinolates a nitro compounds. In: Cutler H. G, Ed. *Biologically active natural products: potential use in agriculture, series 380.* American Chemical Society, New York, 143-154.
- Coyle, J y Puttfarken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science.* 262: 689-694.
- Coyle, J. T y Schwarcz, R. (1976). Model for Huntington ' s chorea: lesion of striatal neurons with kainic acid. *Nature.* 263: 244-246.
- Coyle, J.T., Molliver, M.R y Kuhar, M.J. (1978). *In situ* injection of kainic acid, a new method for selectively lesioning neural cell bobies while sparing axons of passage. *J. Comp. Neurol.* 180: 301-318.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Conzens, B.A y col. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction, in mice transgenic for the Huntington ' s disease mutation. *Cell.* 90: 537-548.
- Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M y col. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH. Diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7797-7801.
- Dexter, D.T., Carayon, A., Jaroy-Agid, F y col. (1991). Alterations in the levels of iron, Ferritin and other trace metals in Parkinson ' s disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain.* 114: 1953-1975.
- Difilgia, M., Sapp, E., Chase, K y col. (1995). Huntingtin as a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron.* 14: 1075-1081.

- Diffligia, M., Sapp, E., Chase, K y col. (1997). Aggregation of huntingtin in neural intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*. 277: 1990-1993.
- Dildy-Mayfield, J.E., y S.W. Leslie. (1991). Mechanism of inhibition of N-methyl-D-aspartate stimulated increases in free intracellular Ca^{2+} concentration by ethanol. *J. Neurochem.* 56: 1536-1543.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, S.D y col. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-Aspartate. *J. Neurosci.* 15: 6377-6388.
- Dunbar, G.L., Shear, D.A., Dong, J y col. (2000). Cognitive and motor deficits produced by acute and chronic administration of 3-nitropropionic acid in rats: Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders. *Humana Press*. Totowa, New Jersey. 73-92.
- Erecinska, M y Nelson, D. (1994). Effects of 3-nitropropionic acid on synaptosomal energy and neurotransmitter metabolism relevance to neurodegenerative brain diseases. *J. Neurochem.* 63: 1033-1041.
- Farmer, B.T y Butterfield, D.A. (1985). Quinolinic acid, an endogenous metabolite with neurotoxic properties alters the physical state of membrane proteins in human erythrocytes. *Life. Sci.* 35: 501-509.
- Ferkany, J.W., Zaezek, R y Coyle, J.T. (1982). Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature*. 298: 757-759.
- Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F y col. (1985). Selective sparing of a class of striatal neurones in Huntington 's disease. *Science*. 230: 561-563.
- Fu, Y. T., He, F.S y Zhang, J.S. (1995). Lipid peroxidation in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid. *Toxicol.* 33: 327-331.
- García, F y Massieu, L. (1992). Las enfermedades de Alzheimer y Parkinson: Avances teóricos y experimentales. *Ciencia* . 44: 455-472..
- Gayle, J.S. *et al.* (1978). Human brain substance P: distribution in controls and Huntington 's chorea. *J. Neurochem.* 30: 633-634.
- Geddes, J.W., Bondada, V y Pang, Z. (2000). Mechanism of 3-nitropropionic acid neurotoxicity: Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders. *Humana Press* Totowa, New Jersey. 107-120.
- Ghibelli, L., Fanelli, C., Rotilio, G y col. (1998). Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB. J.* 12: 479-486.
- Gourfinkel-An, Y., Cancel, Y., Trotter, D y col. (1997). Differential distribution of the normal and mutated forms of huntingtin in the human brain. *Ann. Neurol.* 42: 1161-1167.
- Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H y col. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* 21(1): 171-179.
- Griffith, O.W., Bridges, R.J y Meister, A. (1979). Transport of γ -glutamyl amino acids: role of glutathione and γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 6319-6322.
- Griffith, O.W y Meister, A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4668-4672.
- Grisham, M. (1992). Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *R.G. Loudes. Co.* 5-19.

- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M y col. (1996). Mitochondrial defect in Huntington 's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39: 385-389.
- Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M y col. (1983). Apolymorphic DNA marker genetically linked to Huntington 's disease. *Nature.* 306: 234-238.
- Gusella, J.F., MacDonall, M.E., Ambrose, S.M y col. (1993). Molecular genetics of Huntington 's disease. *Arch. Neurol.* 50: 1157-1163.
- Hageman, J., Bast, A y Vermeulen, N.P. (1992). Monitoring of oxidative free radical damage *in vivo* analytical aspects. *Chem. Biol. Interactions.* 87: 243-293.
- Hamilton, B.F y Gould.D.H. (1987). Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol. (Berlin).* 72: 286-297.
- Hassel, B y Sonneward, U. (1995). Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid *in vivo*. *J. Neurochem.* 65: 1184-1191.
- Hedreen, J.C y Folstein, S.E.. (1995). Early loss of neostriatal striosome neurones in Huntington 's disease. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.* 54: 105-120.
- Heyes, M.P., Wreu, B., Martin, A y col. (1989). Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Ann. Neurol.* 26(2): 275-277.
- Hissin, P y Hilf. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Biochemistry.* 74: 214-216.
- Hornykiewicz, O. (1982). *Movement disorders.* London, Butterworth Scientific. 41 pp.
- Huntington, G. (1872). On chorea. *Lea and Blanchard. Philuladelphia Med. Surg. Rep.* 26: 317.
- Huntington disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington 's disease chromosomes. *Cell.* 72: 971-983.
- Joynt, J.R. (1990). The extrapyramidal system and disorders of movement. In *clinical neurology.* Vol. 3. J.B. Lippincott Company. Philadelphia, U.S.A. Chap. 38: 49-57.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H y Jessell, T.H. (1991). *Principles of neural science.* Appleton and Lange. Norwalk, Connecticut. 156-157.
- Kannan, R. (1992). Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263(3): 964-970.
- Kemper, T.I. (1983). Organization of the neuropathology of the amygdala in Alzheimer 's disease. *Biological aspects of Alzheimer 's disease.* Banbury Rep. 15 R. Katzman (de). Cold. Spring Harbor Laboratory. 31-35.
- Kim, J.P y Choi, D.W. (1991). Quinolinic neurotoxicity in cortical cell cultive. *Neuroscience.* 23: 423-432.
- Kowall, N.W., Ferrante, R.J y Martin, J.B. (1987). Patterns of cell loss in Huntington' s disease. *Trends. Neurosci.* 10: 24-29.
- Kretzschmar, M., y col. (1991). Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int. J. Sports. Med.* 218-222.
- Leigh, y col. (1983). Abnormal ocular motor control in Huntington 's disease. *Arch. Neurol.* 35: 585-589

- Lehmann, A., Hagbrg, H., Jacobzon, I y col. (1985). Effects of status epilepticus on extracellular amino acids in the hippocampus. *Brain Res.* 359: 147-151.
- Leslie, S.W., Brown, L.M., Trent, R.D y col. (1991). Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium entry into dissociated neurons by reduced and oxidized glutathione. *Molecular Pharmacology.* 41: 308-314.
- Lindenau, J., Noack, H., Asayama, K y col. (1998). Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *GLIA.* 24: 252-256.
- Liu, X.J. (1986). Investigations on the etiology of mildewed sugarcane poisoning. A review. *Chin. J. Prevent. Med.* 20: 306-308.
- Lombardi, G.G., Carla, B., Moneti, G y col. (1983). Developmental changes of the content and synthesis of quinolinic acid in the rat brain. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 53 (1): 24.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L y col. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, Y.M., Zhang, J.T., Zhao, F.Q y col. (1991). Effects of calcium antagonists on glutamate release and calcium influx in the hippocampus with *in vivo* intracerebral microdialysis. *Br. J. Pharmacol.* 104: 222-226.
- McGeer, E.G y McGeer, P.L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington 's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acid. *Nature.* 263: 517-519.
- MacGeer, E.G., MacGeer, P.L y Singh, K. (1978). Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: Dependence upon corticostriatal tract. *Brain Res.* 139: 381-383.
- MacMillan J y O. Quarrel. (1996). The neurobiology of Huntington 's disease. In *Huntington 's disease.* (P. Harper. Eds). Saunders, The University Press, Cambridge. 317-358.
- Martansson, J.M., Lai, J.C.K y Meister, A. (1990). High affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7185-7189.
- Meister, A. (1994). Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Research.* 54: 1969-1975.
- Melamed, E., Hefi, F y Bird, E.D. (1982). Huntington 's chorea is not associated with hyperactivity of nigrostriatal dopaminergic neurons: studies in postmortem tissues and in rats with kainic acid lesions. *Neurology.* 32: 640-644.
- Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229: 189.
- Mishina, M., Mori, H., Araki, K y col. (1993). Molecular and functional diversity of the NMDA receptor channel. *Ann. N.Y. Sca. Sc.* 707: 136-152.
- Monaghan, D.T., Bridges, R.J y Codman, C.W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402.
- Moroni, F., Lombardi, G., Carla, V y col. (1984). The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. *Brain Res.* 285: 352-255.
- Nadler, J.V y Cuthbertson, G.J. (1980). Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res.* 195: 47-56.

- Nakao, N. (1996). Protection of striatal and nigra neurons by trophic and antioxidant mechanisms: A study on *in vitro* and *in vivo* brain insult models and neural transplants. Wallin and Dhlholm, Lund.
- Nishino, H., Shimano, Y., Kumazaki, M, y col. (1995). Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* 186: 161-164.
- No y Oswald. (1995). Unraveling the modular desing of glutamate-gated ion channels. *Trend. Neurosci.* 18: 161-168.
- Noack, H., Lindenau, J., Rothe F y col. (1998). Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neural and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitreergic stress. *GLIA* 23: 285-297.
- Ogita, K., Kitago, T., Nakamura, H y col. (1986). Glutathione-induced inhibition of Na – independent and dependent binding of L-[H]glutamate in rat brain. *Life Sci.* 39: 2411-2418.
- Olney, J.W. (1969). Brain lesion, abesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 164: 719-721.
- Page, J. K., Meldrum, A y Dunnett, G. B. (2000). Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders. Ed. P.R. Samberg, H. Nishino y V. Borlongan. Humana Press. Inc. Totowa, New Jersey. 141-156.
- Pang, Z y Geddes, J.W. (1997). Mechanism of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid acute necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.* 19: 3064-3073.
- Paxinos, G y Watson, G. (1984). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney.
- Perry, T.L., Godin, D.V y Hensson, S. (1982). Parkinson 's disease: A disourse due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.* 33: 305-310.
- Petersén A., Maní K y Brandin P. (1999). Recent advances on the pathogenesis of Huntington 's disease. *Exp. Neurol.* 157: 1-18.
- Qin, Y., Soghomonian, J.J y Chesslet, M.F. (1992). Efects of quinolinic acid messsenger RNAs in coding somatostatin and glutamic acid descaboxylases in the striatum of adults rats. *Exp. Neurol.* 115: 200-211.
- Ranen, N.G., Stine, O.C., Abbott, M.H y col. (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offsprins pairs with Huntington 's disease. *Am. J. Hun. Genet.* 57: 593-602.
- Raps, S.P., Lai, J.C., Hertz, L y Cooper, A.J. (1989). Glutathione is present in higt concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Research.* 493: 398-401.
- Reynolds, I.J y R.J. Miller. (1990). Allosteric modulation of N-Methyl-D-aspartate receptors. *Adv. Pharmacol.* 21: 101-126.
- Rios, C and Santamaria, A. (1991). Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res.* 16: 1139-1143.
- Saggi, H.J. Cooksey, D. Dexter, F.R. Wells. A, Lees., P, Janner., C.D, Marsden. (1989). *53: 692-697.*

- Santamaria y Rios. (1993). Mk-801 an N-Methyl- D-Aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid -induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosc. Lett.* 159: 51-54.
- Sato, S., Gobbel, G.T., Honkaniemi, J y col. (1997). Apoptosis in the striatum of rats following intraperitoneal injection of 3-nitropropionic acid. *Brain Res.* 745: 343-347.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M y col. (1997). Huntingtin encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates *in vitro* and *in vivo*. *Cell.* 90: 549-558.
- Schulz, J.B., Henshaw, D.R., Siwek, D, y col. (1995). Involvement of free radicals in excitotoxicity *in vivo*. *J. Neurochem.* 64: 2239-2247.
- Schwarcz, R., Foster, A.C., French, E.D y col. (1984). Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life. Sci.* 35: 19-32.
- Schwarcz, R., Okuno, E., White, R.J y col. (1988). 3-Hydroxiantranilate oxygenase activity is increased in the brain of Huntington 's disease victims. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4079-4081.
- Seddon, A.P., y Meister, A. (1986). Trapping of an intermediate in the reaction catalyzed by 5-oxoprolinase. *J.Biol. Chem.* 261: 11538-11541.
- Seto-Oshima, A., Emson, P.C., Lawson, E y col. (1988). Loss of matrix calcium-binding protein containing neurons in Huntington 's disease. *Lancet.* 4: 1252-1255.
- Sharp, A.H y C.A. Ross. (1996). Neurobiology of Huntington 's disease. *Neurobiol. Dis.* 3: 3-15.
- Shoulson, I. (1982). Core of patients and families with Huntington 's disease. In: Marsden, C.D and Fahn, S. (eds). *Movement disorders.* London Butterworth.
- Smith, C.V. (1991). Correlations and apparent contradictions in assessment of oxidant stress status *in vivo*. *Free. Rad. Biol. Med.* 10: 217-224
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H y col. (1983). Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience.* 10: 1301-1315.
- Sperek, G. (1994). Kainic acid seizures in the rat. *Prrogress in Neurobiology.* 42: 1-32.
- Spokes, E.G., Garret, N.J y Iversen, L.L. (1979). Differential affects of agonal states of measurement of GABA and glutamate descarboxilase in human postmortem brain tissue from control and Huntington 's chorea subjects. *J. Meurochem.* 33: 773-778.
- Spokes, E.G. (1980). Neurochemical alterations in Huntington 's chorea. A study of postmortem brain tissue. *Brain.* 103: 179-210.
- Stone, T.W. (1993). Excitatory amino acids and dementia. In therapeutic approaches to the treatment of dementia, edd by C.D. Nicholson, Academic Press, London, U.K. in Press
- Sucker, T.W. (1991). Redox modulatory site of the NMDA receptor channel complex: regulation by oxidized glutathione. *Brain Res.* 301: 256-259.
- Thompson, G.A y Meister, A. (1975). Utilization of L-cysteine by the γ -glutamyl transpeptidase- γ -glutamyl cyclotransferase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 1985-1988.
- Vender, A.D. (1975). The kynurerine pathway of tryptophan catabolism. In: amino acid metabolism. John Wiley and Sons. U.S.A. 172-177.
- Walling, H., Balassare, J. J y Westfall, T.C. (1998). Molecular aspects of Huntington 's disease. *J. Neuros. Res.* 54: 301-308.

- Weiss y col. (1990). The calcium channel blockade of excitatory amino acid receptors. In excitatory amino acids in health and disease, edited by D. Lodge. 13-45. John Wiley, London, U.K
- Wellington, C.L., Ellerby, L.N., Hackman, A.S y col. (1998). Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 273: 9158-9167.
- Whitehouse, P.J., Trifiletti, R.R., Jones, B.E y col. (1985). Neurotransmitter receptor alterations in Huntington 's disease: autoradiographic and homogenate studies with special reference to benzodiazepine receptor complexes. *Ann. Neurol.* 18: 202-210.
- Wildholz, M y col. (1976). In: the merck index. Ninth edition. New Jersey. Merck and Co. Inc.
- Wolfensberger, M., Amsler, U., Cuenod, M y col. (1984). Identification of quinolinic acid in rat human brain tissue. *Neurosci. Lett.* 41: 247-252.
- Young, A.B., Greenamyre, J.T., Hollings-Worth, Z y col. (1988). NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington 's disease. *Science.* 241: 981-983.
- Yudkoff, M., Pleasure, D., Cregar, L y col. (1990). Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with (¹⁵N)-glutamate. *J. Neurochem.* 55: 137-145.
- Zeevalk, G.D., Bernard, L.P., Sinha, C y col. (1998). Excitotoxicity and oxidative stress during inhibition of energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 20: 444-453.
- Zentella de Piña, M., Saldaña-Balmori Y., Hernandez Tobías A y Piña E. (1993). Non-steroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid, reactive substances. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17(6): 1228-1232.
- Zentella de Piña M., Saldaña-Balmori y Corona García S. (1994). Toxicidad del oxígeno, papel de los radicales libres en la peroxidación de lípidos. 13(3): 87-93.