

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL FeTPPS EN LA NEUROTOXICIDAD
INDUCIDA POR ÁCIDO QUINOLÍNICO

TESIS EXPERIMENTAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :
VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ

México D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Beatriz Albina Medina Jiménez

VOCAL: M en C. Carlos Pérez Muñoz

SECRETARIO: Dr. José Pedraza Chaverrí

1^{er} SUPLENTE: Dr. Javier Plasencia de la Parra

2^o SUPLENTE: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

Este trabajo fue apoyado por DGAPA IN227103 y IX203504 IN227103, se desarrolló en el Laboratorio 209, edificio B, Facultad de Química UNAM en colaboración con el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores/Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía *Manuel Velasco Suárez*, México D.F.

ASESOR

Dr. José Pedraza Chaverrí

SUSTENTANTE

Verónica Pérez de la Cruz

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. José Pedraza por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto.

Al Dr. Abel Santamaría por apoyarme en esta etapa de mi formación profesional y sobre todo por creer en mi, de igual manera agradezco a la Bióloga Sonia Galván y a la Dra. Francisca Pérez por el apoyo que me brindaron.

A Carolina González por ayudarme en la realización de este trabajo y por brindarme su amistad.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres por haber dado todo con tal de que alcance mis sueños, por guiarme con mano firme y por enseñarme a superar momentos difíciles, pero sobre todo por enseñarme a ser una persona con decisiones firmes y alcanzar siempre las metas que me propongo.

A mis hermanos Gonzalo y Carlos quienes en todo momento están conmigo y quienes me animan a superarme día con día.

A mis tíos José e Ismael por alentarme a seguir adelante y apoyarme incondicionalmente.

A la familia Sánchez de la Cruz por apoyarme y quererme.

A Hugo por compartir conmigo mis risas y lagrimas y sobre todo mis sueños.

A mi amigo Sebastián por apoyarme en todo momento.

A mis mascotas, sobre todo a Mango por darme momentos de alegría inigualables.

INDICE

1. ABREVIATURAS.....	3
2. RESUMEN.....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Enfermedad de Huntington.....	5
3.1.1 Antecedentes.....	5
3.1.2 Alteraciones bioquímicas de la enfermedad de HD.....	5
3.1.3 Modelos experimentales de la enfermedad de HD.....	6
3.2 Receptores.....	7
3.2.1 Tipos de receptores.....	8
3.2.2 Receptores glutamatérgicos.....	8
3.3 Ácido quinolínico.....	9
3.3.1 Vía de la kinurenina.....	9
3.3.2 Efectos tóxicos.....	10
3.4 Estrés oxidativo.....	11
3.4.1 Especies reactivas de oxígeno.....	11
3.4.2 Peroxidación de lípidos	13
3.4.3 Antioxidantes en sistemas biológicos.....	14
3.5 Oxido nítrico.....	16
3.5.1 Sintetasas de oxido nítrico.....	17
3.6 Peroxinitrito.....	18
3.6.1 Formación.....	18
3.6.2 Toxicidad.....	20
3.7 Metaloporfirinas.....	20
3.7.1 Generalidades.....	22
3.7.2 Mecanismos de acción.....	22
3.7.3 FeTPPS.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25

5. OBJETIVOS.....	25
6. MATERIALES Y METODOS.....	26
6.1 Diagrama de flujo.....	26
6.2 Pretratamiento de los animales con FeTPPS e inyección intraestriatal con QUIN.....	27
6.3 Obtención de sinaptosomas.....	27
6.4 Peroxidación de lípidos.....	28
6.4.1 Método fluorométrico (in vivo).....	28
6.4.2 Método fluorométrico (in vitro).....	28
6.5 Determinación de proteínas.....	30
6.6 Determinación de la superóxido dismutasa.....	31
6.7 Determinación de la actividad de la sintasa de óxido nítrico...	32
6.8 Análisis estadístico.....	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1 Actividad de superóxido dismutasa.....	34
7.2 Peroxidación de lípidos in vivo.....	35
7.3 Determinación de la actividad de las sintasas de óxido nítrico..	36
7.4 Efectos de peroxidación lipídica in vitro a diferentes concentraciones de FeTPPS y MnTBAP.....	37
8. DISCUSIÓN.....	38
9. RESUMEN DE RESULTADOS.....	39
10. CONCLUSIONES.....	39
11. PERSPECTIVAS.....	40
12. BIBLIOGRAFÍA.....	41

1. ABREVIATURAS

❖ AMPA	α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
❖ BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
❖ CaM	Calmodulina
❖ EROs	Especies reactivas de oxígeno
❖ FeTPPS	5,10,15,20-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirinato de Fe(III)
❖ GABA	Ácido γ -amino butírico
❖ HD	Enfermedad de Hungtinton
❖ H ₂ O ₂	Peroxido de hidrógeno
❖ IBO	Ácido iboténico
❖ KA	Ácido kaínico
❖ MnTBAP	Tetrakis-(4-acido benzoico)porfirinato de Mn(III)
❖ NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
❖ NBT	Nitrozul de tetrazolio
❖ NMDA	N-metil-D-aspartato
❖ NO	Oxido nítrico
❖ NOS	Sintasa de óxido nítrico
❖ NOSc	Sintasa de óxido nítrico constitutiva
❖ NOSi	Sintasa de óxido nítrico inducible
❖ NOST	Sintasa de óxido nítrico total
❖ O ₂ ⁻	Anión superóxido
❖ •OH	Radical hidroxilo
❖ ONOO ⁻	Peroxinitrito
❖ ONOOH	Ácido peroxinitroso
❖ PPSE	Potencial postsináptico excitatorio
❖ QUIN	Ácido quinolínico
❖ SOD	Superóxido dismutasa

2. RESUMEN

Antecedentes. El ácido quinolínico (QUIN) es una excitotoxina que reproduce el modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington en ratas. El QUIN es un agonista glutamatérgico del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y causa degeneración en regiones específicas del cerebro; genera sus efectos vía la sobreactivación de receptores NMDA produciendo neurotoxicidad a través de mecanismos de excitotoxicidad y daño oxidativo. Además, el óxido nítrico (NO) está involucrado en el daño neuronal inducido por QUIN.

Objetivo. El objetivo es demostrar si el peroxinitrito, el cual se forma por la reacción entre el anión superóxido y el NO, está involucrado en el efecto prooxidante del QUIN.

Métodos. Para cumplir con el objetivo utilizamos una metaloporfirina (FeTPPS) que es capaz de catalizar la descomposición de peroxinitrito a nitratos y nitritos. Se utilizaron ratas macho Wistar que fueron tratadas con FeTPPS (10 mg/Kg) dos horas antes de la lesión intraestriatal con QUIN (240 nmol/ μ L). Dos horas después de la inyección con QUIN se obtuvo el cuerpo estriado de las ratas para evaluar los siguientes parámetros: actividad de la superóxido dismutasa (SOD), actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS), peroxidación de lípidos y nitración de proteínas por inmunohistoquímica. También se estudió el efecto del FeTPPS y del MnTBAP (otra metaloporfirina que descompone peroxinitrito) sobre la peroxidación de lípidos inducida por QUIN en preparaciones sinaptosomales *in vitro*; esto se realizó con el propósito de comparar el efecto de una porfirina de Mn (MnTBAP) y una de Fe (FeTPPS).

Resultados. El tratamiento de las ratas con QUIN disminuyó la actividad de SOD y aumentó la actividad de la NOS y la peroxidación de lípidos. El tratamiento con FeTPPS previno estos cambios. Además, la actividad de la NOS disminuyó por abajo del control en el grupo de ratas tratadas con QUIN y FeTPPS. La incubación de sinaptosomas con QUIN aumentó la peroxidación de lípidos y el FeTPPS y el MnTBAP previnieron este aumento aún a la menor concentración utilizada.

Conclusión. Estos resultados sugieren que el FeTPPS protege del daño oxidativo inducido por QUIN, pero que no únicamente actúa vía descomposición de peroxinitrito, sino que está actuando desde antes de su formación, es decir está inhibiendo la producción de NO. Por lo cual sería muy conveniente realizar experimentos adicionales para esclarecer el mecanismo por el cual el FeTPPS es capaz de inhibir a la NOS en las ratas tratadas con QUIN.

3.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

3.1.1 Antecedentes

En 1872, George Huntington describió a un grupo de pacientes que su padre y abuelo atendían en East Hampton, Long Island. En esta enfermedad se destacaban cuatro características: herencia, corea, demencia y muerte después de 15-20 años de haber presentado los síntomas; se presenta con la misma frecuencia en hombres y mujeres.

El trastorno que este médico definió pasó a ser conocido como la enfermedad de Huntington (HD), la cual fue caracterizada clínicamente por alteraciones del movimiento, de la capacidad intelectual y de la conducta. Las alteraciones del movimiento en los primeros estadios de la enfermedad corresponden a una hipercinesia caracterizada por movimientos breves e involuntarios de los músculos de las extremidades, del tronco y de la cara; al presentarse en las piernas ocasionan alteración en la marcha. Cuando llegan a un estado en el que los individuos se asemejan a las actitudes de bailarines son llamados movimientos coreiformes, los cuales dan origen al nombre de corea de Huntington. Además de las alteraciones motoras, los pacientes con HD sufren pérdida de memoria y alteración en las funciones intelectuales.

Es un desorden neurológico hereditario cuyo gen autosómico dominante se localiza en el brazo corto del cromosoma 4 (Gusella et al., 1983), causado por la mutación en las repeticiones del trinucleótido CAG del ADN. Esta enfermedad es caracterizada por la degeneración de la corteza cerebral y el estriado. Los pacientes con HD tienen más de 35 repeticiones de CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina (Hannan, 2004). Cuando se presenta HD en pacientes jóvenes, estos llegan a presentar de 70-250 repeticiones del trinucleótido CAG.

3.1.2 Alteraciones bioquímicas de la enfermedad de Huntington

Las alteraciones bioquímicas que se observan en el cuerpo estriado parecen ser aquellas derivadas de la muerte de las neuronas, así se observa disminución notable de los niveles de GABA y de la enzima que lo sintetiza, la descarboxilasa del ácido glutámico; de acetilcolina y de su correspondiente enzima de síntesis, la colina-acetil transferasa (CAT), la reducción de los niveles de los péptidos localizados en las neuronas espinosas y la

disminución del número de los receptores de aminoácidos excitadores localizados en las espinas dendríticas de las neuronas que degeneran (Pasantes et al., 2000), además los niveles de somatostatina y neuropéptido Y están incrementados más de 3 a 5 veces en núcleo caudado/putamen y el globo pálido, sin cambios en otras áreas del cerebro (Schwarcz et al., 1983).

3.1.3 Modelos experimentales de HD

La excitotoxicidad como posible causa de la muerte neuronal en HD se apoya en las pruebas experimentales que señalan que la inyección de antagonistas de aminoácidos excitadores como el ácido kaínico (KA) y el ácido quinolínico producen ciertos cambios anatómicos, histológicos, bioquímicos y funcionales que se presentan en los pacientes con HD (Pasantes et al., 2000).

Algunas sustancias como el KA, el ácido iboténico (IBO) y el ácido quinolínico, poseen una estructura similar al glutamato y cuando son administrados intracerebralmente ocasionan daño neuronal específico, por lo que estos fármacos demostraron tener un efecto neurotóxico, pero con diferencias específicas con respecto a las presentadas en la HD (Pérez-Severiano y Ríos, 2000). La tabla 1 muestra los resultados que se obtuvieron al probar estas sustancias y las diferencias con respecto a HD.

Tabla 1. Características de los modelos de la HD

Molécula neuroactiva	Pacientes (HD)	ratas (KA/IBO)	ratas QUIN	ratas 3-NPA
GABA/GAD	↓	↓	↓	↓
Acetilcolina/CAT	↓	↓	↓	↓
Sustancia P	↓	↓	↓	—
Dopamina	—	—	—	↓
Somastostatina	↑	↓	—	—
Neuropeptido Y	↑	↓	—	—
Encefalina	↓	—	↓	—
Sobreactivación de Receptores NMDA	↑	—	↑	—
	↑ Aumenta	↓ Disminuye	— Sin cambios	

A diferencia de los otros agentes, el QUIN no alteró la inmunoreactividad de la somatostatina ni del neuropéptido Y, de modo muy semejante a lo que ocurre en la HD, estableciendo así una selectividad fundamental con respecto a los otros agentes excitadores (que sí los afectan), y proporcionando un patrón de toxicidad más específico. De este estudio (Beal et al., 1986) se ha profundizado más sobre el QUIN, postulándolo como la excitotoxina capaz de reproducir más fielmente las características bioquímicas, histopatológicas y conductuales de la enfermedad (Block et al., 1993; Bruyn y Stoof, 1990; Hantraye et al., 1990; Sanberg et al., 1989; Schwarcz et al., 1984).

3.2 RECEPTORES

3.2.1 Tipos de receptores

Existen dos clases principales de receptores:

- Receptores ionotrópicos que son aquellos en los cuales la molécula receptora también es un canal iónico.
- Receptores metabotrópicos aquellos en los cuales el receptor y el canal iónico son moléculas separadas.

Los receptores ionotrópicos, están relacionados directamente con los canales iónicos, y contienen dos dominios funcionales: un sitio extracelular que se une a los neurotransmisores y un dominio de expansión de la membrana que forma un canal iónico. Estos receptores combinan tanto funciones de fijación del transmisor como de canal en la única entidad molecular, y por lo tanto, también se denominan canales iónicos regulados por ligando. Este tipo de receptores dan origen a las respuestas postsinápticas rápidas que en casos típicos duran solo algunos milisegundos.

La segunda familia de receptores de neurotransmisores son los receptores metabotrópicos (denominados así por que el movimiento eventual de iones a través de un canal depende de uno o más pasos metabólicos). Estos receptores no poseen canales iónicos como parte de su estructura; en cambio afectan a los canales por la activación de las moléculas intermediarias llamadas proteínas G. Por esta razón los receptores

metabotrópicos también se denominan receptores acoplados a la proteína G. Los receptores metabotrópicos son proteínas monoméricas con un dominio extracelular que contienen un sitio de fijación del neurotransmisor y un dominio intracelular que se une a las proteínas G. La fijación de los neurotransmisores a los receptores metabotrópicos activa a las proteínas G, las cuales se disocian luego del receptor e interactúan directamente con los canales iónicos o se unen a otras proteínas efectoras, como las enzimas, que entonces cambian la conductancia de los canales iónicos.

3.2.2 Receptores glutamatérgicos

Hay tres tipos de receptores para el glutamato identificados:

- Receptores NMDA
- Receptores AMPA/kainato
- Receptores mGluR

Dos son canales iónicos regulados por ligando denominados, respectivamente receptores NMDA y receptores AMPA/kainato. Su nombre derivan de los agonistas que los activan: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato) y ácido kaínico. Los receptores AMPA/kainato también se denominan receptores no NMDA.

El tercer tipo de receptores para el glutamato es el receptor metabotrópico mGluR, el cual modula los canales iónicos postsinápticos al activar a las proteínas G.

Los receptores AMPA/kainato son responsables de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) mas rápidos producidos por el glutamato. Al igual que otros receptores de canales regulados por ligando, estos receptores están formados por varias subunidades de proteínas que pueden reunirse de diferentes maneras para producir una amplia gama de tipos de receptores. El poro central formado por estas subunidades permite la entrada y salida de Na^+ y de K^+ y en algunos casos de pequeñas cantidades de Ca^{2+} .

La subfamilia NMDA de los receptores para glutamato también forma canales iónicos selectivos de cationes con múltiples subunidades, similares a la mayoría de los otros

receptores de canales iónicos regulados por ligando. Sin embargo, estos receptores poseen algunas propiedades funcionales únicas que los tornan especialmente interesantes. Tal vez lo más importante es el hecho de que los canales iónicos de los receptores NMDA permiten la entrada de Ca^{2+} además de cationes monovalentes como Na^+ y K^+ . En consecuencia los PPSE producidos por los receptores NMDA pueden aumentar las concentraciones de Ca^{2+} en el interior de la neurona postsináptica; entonces el cambio de concentración de Ca^{2+} puede actuar como segundo mensajero para activar cascadas de señalamiento intracelular. Otras características de los receptores NMDA son que la apertura del canal requiere la presencia de un coagonista (el aminoácido glicina) y que el Mg^{2+} extracelular bloquea el canal en los voltajes hiperpolarizantes, pero no en los despolarizados. Por ende los receptores NMDA permiten el paso de cationes solo cuando se elimina el bloqueo de Mg^{2+} mediante la despolarización de la célula postsináptica, sea por eferencias provenientes de muchas neuronas postsinápticas o por el disparo repetitivo de la célula presináptica

3.3 ACIDO QUINOLÍNICO

3.3.1 Vía de la kinurenina

El ácido quinolínico (ácido-2,3-piridín dicarboxílico) es un metabolito endógeno de la vía degradativa de la kinurenina (Fig. 1) y conocido agonista de los receptores para N-metil-D-aspartado (NMDA). La vía tiene tres intermediarios neuroactivos, el ácido kinurénico (KYNA), la 3-hidroxicinurenina (3-HK) y el ácido quinolínico (QUIN) (Schwarcz y Pellicciari, 2002).

El QUIN es sintetizado en la microglia y los macrófagos en el estriado de la rata a través de la 3-hidroxiantranilato oxigenasa. Bajo condiciones normales, gran parte del triptofano catabolizado sigue la vía hasta formar acetil-CoA. Sólo una pequeña proporción del metabolismo diario del triptofano deriva a otros metabolitos. Sin embargo, la alteración del catabolismo del triptofano está involucrada en desórdenes como el complejo SIDA-demencia, esquizofrenia, daño hepático, entre otros (Ravikumar et al., 2000).

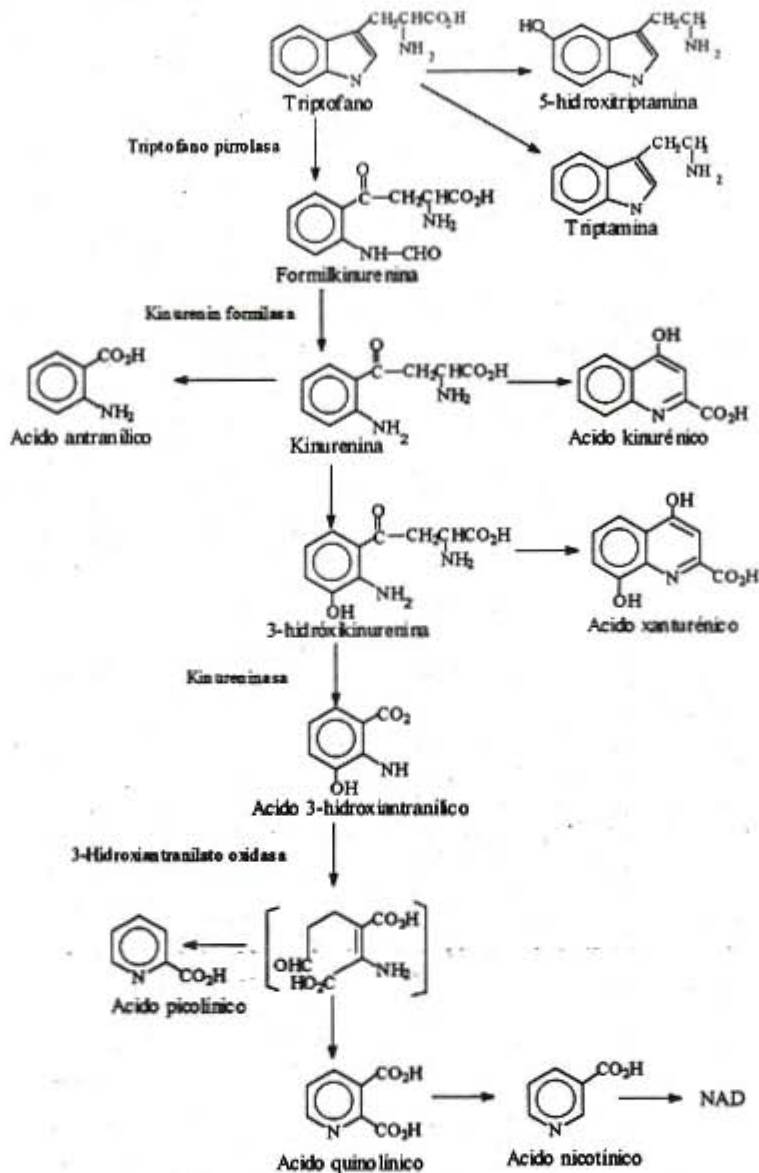


Figura 1. Vía degradativa de la kinurena

3.3.2 Efectos tóxicos

El primer indicio de que las kinureninas son importantes en el cerebro fue proporcionado por Lapin (1978), quien notó convulsiones después de una inyección intracerebroventricular en ratones. El daño excitotóxico producido por QUIN se debe a la sobre activación de receptores NMDA (Schwarcz et al., 1984).

El QUIN produce una gran variedad de efectos tóxicos en el cerebro, como la disminución de GABA, un incremento excesivo de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, agotamiento de ATP, estrés oxidativo neuronal, peroxidación de lípidos y muerte celular (Foster et al.,

1983; During et al., 1989; Santamaría y Ríos, 1993). Adicionalmente, el QUIN, está involucrado en infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, meningitis, enfermedades autoinmunes y septicemia (Heyes et al., 1992).

Recientemente se ha enfocado la atención en la habilidad del QUIN para ejercer acciones neurotóxicas independientes del receptor NMDA, involucrando estrés oxidativo y daño peroxidativo. Estos mecanismos incluyen la formación de complejos QUIN-Fe²⁺ mediados por la generación de EROs (Goda et al., 1996; Stípek et al., 1997; Murakami et al., 1998; Iwahashi et al., 1999), alteración en algunos antioxidantes endógenos y la generación directa de radicales hidroxilos en el cuerpo estriado (Santamaría et al., 2001).

3.4 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis, la óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce por una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo al daño celular.

Al parecer son tres las alteraciones intracelulares que de forma directa ocasionan el estrés oxidativo (Rice-Evans y Burdon, 1993)

1. La sobreproducción de especies oxidantes como el H₂O₂ y de radicales libres, como el anión superóxido.
2. Descompartimentación de los complejos iónicos presentes en algunas macromoléculas de importancia biológica.
3. La modificación de defensas contra los radicales libres.

3.4.1 Especies reactivas de oxígeno

Un radical libre es una especie química que contiene uno a mas electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente “no radical”. La mayoría de los radicales libres de

interés clínico son los derivados del oxígeno (Zentella y Saldaña, 1996), ya que ésta es la molécula más abundante en un sistema biológico. Las especies reactivas de oxígeno son intermediarios toxicológicos predominantes y están comúnmente involucrados en el estrés oxidativo (Kehrer, 2000). En la siguiente tabla se muestran una lista parcial de las especies reactivas de oxígeno:

Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno.

RADICALES	NO RADICALES
Anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo ($\bullet OH$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Radical peroxilo ($\bullet OOR$)	Ozono (O_3)
Radical perhidroxilo ($\bullet OOH$)	Oxígeno singulete (1O_2)
Radical alcoxilo ($\bullet OR$)	

Las principales especies reactivas de oxígeno son: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno es la cadena respiratoria, donde pueden ocurrir las siguientes transferencias de electrones:

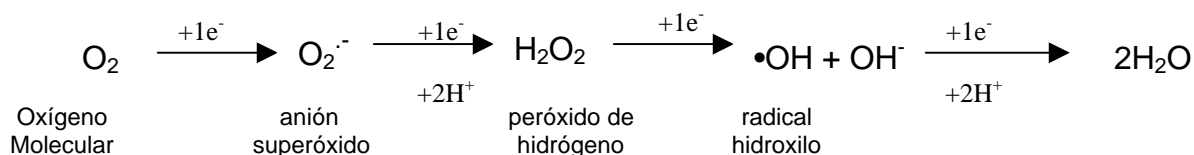
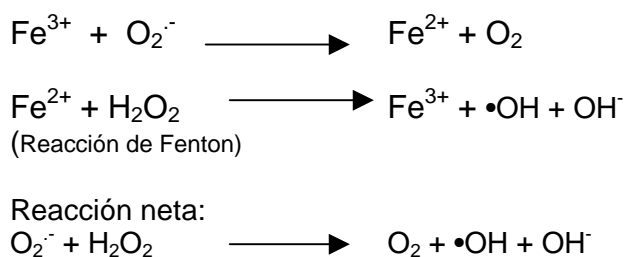


Figura 2. Generación de especies oxidantes de la molécula de oxígeno

La reacción de Haber-Weiss catalizada por el hierro, la cual hace uso de la química de Fenton, es considerada actualmente como el mecanismo principal por el cual el radical hidroxilo es generado en los sistemas biológicos (Kehrer, 2000).



Los radicales libres derivados del oxígeno se producen normalmente en el cuerpo humano; parte de los radicales O_2^- se producen durante las reacciones de varias moléculas directamente con el oxígeno, por ejemplo: la adrenalina, dopamina, el tetrahidrofolato, los citocromos, etc. Además el superóxido también es producido por las células del sistema inmune: los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos).

3.4.2 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se ha definido como un deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados, los cuales son constituyentes esenciales de las membranas biológicas.

Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo y el oxígeno singulete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens y Dix, 1991; Choe et al., 1995, Choi y Yu 1995, Gutteridge y Halliwell, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1984; Horton y Fairhurst, 1987; Niki et al., 1991, Schaich, 1992). En la fase de iniciación comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos de la cadena carbonada para rendir un radical libre lipídico ($L\bullet$). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando el radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el O_2 y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido (figura 2). El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se ve alterada (Rice-Evans y Burton 1993).

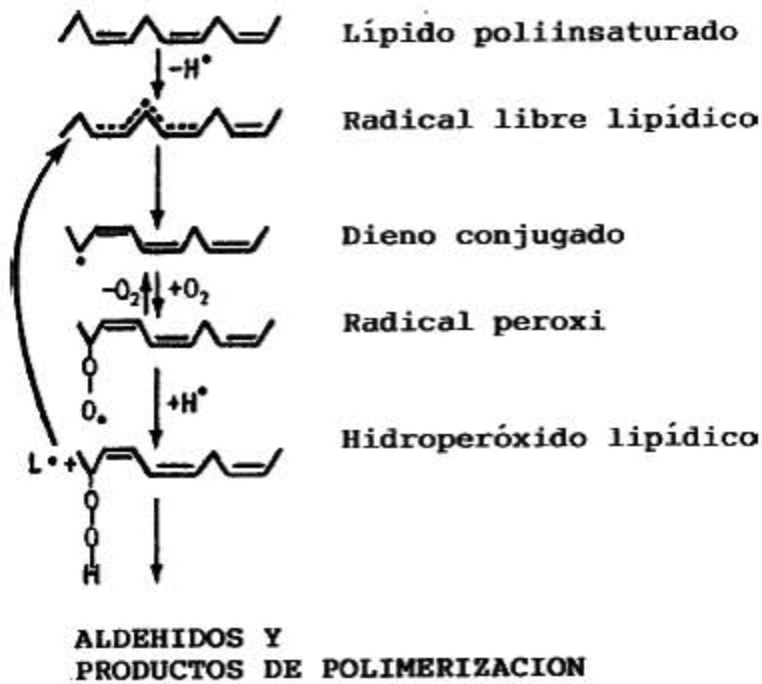


Figura 2. Esquema de la peroxidación de lípidos

3.4.3 Antioxidantes en los sistemas biológicos

Las células poseen sistemas defensivos que les permiten controlar la concentración de las especies reactivas. Estos sistemas son de dos tipos: sistemas antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.

- Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular (Bandyopadhyay et al., 1999). En esencia el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Dentro de estos sistemas no enzimáticos destacan:

- Vitamina E (α -tocoferol): es considerado como el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Tiene la capacidad de interrumpir la peroxidación de lípidos en la fase de propagación reaccionando con los radicales lipoperoxilos y los alcóxilos. Al interaccionar con los lipoperoxidos se genera un radical α -tocoferilo el cual es reciclado a α -tocoferol al interaccionar con el ácido ascórbico, éste tiene la capacidad de interaccionar con $^1\text{O}_2$ y en menor grado con O_2^- (Burton et al., 1982; Halliwell y Gutteridge, 2001).
 - Vitamina C (ácido ascórbico): Distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con el anión superóxido, radical hidroxilo (Frei et al., 1990; Sauer et al., 2001), generando radical ascorbilo, el cual es reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (May et al., 1998).
 - Glutati6n: Su forma reducida se considera como un compuesto antioxidante ya que impide la oxidaci6n de los grupos $-\text{SH}$ de las prote6nas; tiene la capacidad de reaccionar con las especies reactivas de oxigeno transfiri6ndoles un 6tomo de hidr6geno (Halliwell y Gutteridge, 2001).
 - 6cido 6rico. Tradicionalmente es considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, tambi6n posee propiedades antioxidantes, sin embargo se desconoce el proceso por el cual ejerce su acci6n protectora; su mecanismo de acci6n aparente seria prevenir la oxidaci6n de la vitamina C y formar complejos con los metales hierro y cobre (Yu, 1994).
- Sistemas antioxidantes enzim6ticos

Dentro de los sistemas destinados a convertir las especies reactivas de oxigeno en menos reactivas, antes de que se conviertan en mol6culas m6s reactivas, capaces de reaccionar y dañar estructuras celulares; dentro de estos sistemas antioxidantes destacan:

- Super6xido dismutasa (SOD): Es una metaloprote6na, cuya funci6n es catalizar la dismutaci6n del O_2^- a H_2O_2 . La SOD presenta tres isoformas, de las cuales dos tienen como sitio activo al Cu^{2+} y Zn^{2+} ; una de ellas se localiza en el citosol, en el n6cleo y en menor cantidad en el espacio intramembranal y otra extracelularmente en fluidos como el plasma (Oury et al., 1996). La tercera isoforma tiene como sitio activo al Mn^{2+} y se encuentra en la matriz mitocondrial.

- Catalasa: Es una hemoproteína, se concentra principalmente en los peroxisomas y las mitocondrias, su papel antioxidante consiste en disminuir el riesgo de formación del radical hidroxilo por la interacción del H_2O_2 con metales de transición vía la reacción de Fenton (Halliwell, 1999). Su mecanismo catalítico tiene lugar en dos fases: en la primer fase se lleva a cabo el rompimiento de una molécula de H_2O_2 generándose en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de agua, la segunda se caracteriza por la reacción de la especie oxoferrilo con otra molécula de H_2O_2 (Putnam et al., 2000).
- Glutación peroxidasa: Es una selenoproteína que se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. La glutación peroxidasa es eficiente en la degradación de H_2O_2 , requiere de la presencia de glutación reducido para poder llevar a cabo su actividad catalítica (Powers y Lennon, 1999).
- Glutación reductasa: Enzima que requiere NADPH y cataliza la conversión de glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH), esta enzima es esencial para el ciclo redox del glutación reducido que mantiene los niveles adecuados de glutación reducido (Harris y Massey, 1992).

3.5 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico ($\bullet NO$) es un mensajero biológico y un segundo mensajero que participa en algunos procesos fisiológicos tales como regulación del tono vascular, la neurotransmisión y la citotoxicidad celular (Pérez-Severiano et al., 1998). Además, una producción alterada de $\bullet NO$ esta involucrada en diversas situaciones patofisiológicas, como la inflamación aguda y crónica, aterosclerosis, glomerulonefritis y daño renal.

El óxido nítrico influye en la liberación de otros neurotransmisores, presumiblemente a través de la activación de cinasas de proteínas dependientes de $GMPc$, aumentando la fosforilación de las proteínas de las vesículas sinápticas asociadas con la liberación de neurotransmisores. Lo más evidente es que el óxido nítrico se encuentra en la cadena que liga la activación de los receptores para glutamato del tipo NMDA a la liberación de

neurotransmisor en la corteza cerebral o en el estriado (Bogdaanov y Wurtman, 1997; Yun et al., 1996).

3.5.1 Sintetas de óxido nítrico

La síntesis de •NO es catalizada por las óxido nítrico sintetas (NOSs), una familia de tres isoformas (Tabla 3): la NOS neuronal (NOSn) y la NOS endotelial (NOSe) son consideradas constitutivas y su actividad está regulada principalmente a nivel post-traducciona. La isoforma NOS inducible (NOSi) se expresa en varios tipos celulares, como macrófagos y células del músculo liso vascular en respuesta a ciertos estímulos por citocinas o productos bacterianos (Nathan y Xie, 1994).

Tabla 3. Principales características de las tres isoformas de la sintasa de óxido nítrico.

	NOSn Tipo I	NOSi Tipo II	NOSe Tipo III
Dependencia de calcio	Dependiente	Independiente	Dependiente
Principal tipo celular	Neuronas y glía	Macrófagos	Células endoteliales
Cromosoma (humano)	12q24.2	17cen-q12	7q35-36
Transcripción	Constitutiva Inducible en algunos casos	Inducible Inducible en algunos casos	Constitutiva

Las isoformas de NOSs catalizan la conversión dependiente de NADPH y oxígeno molecular de L-arginina a L-citrulina y •NO (Fig. 3) Estas enzimas son flavohemoproteínas diméricas; cuyo monómero está compuesto de un dominio oxigenasa N-terminal que posee un mol equivalente de hemo y sitios de unión para L-arginina y la (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄), además un dominio reductasa terminal que contiene un mol equivalente de flavin adenin dinucleótido, flavin mononucleótido (FMN) y una NADPH (Griffith y Stuehr, 1995, Stuehr, 1997). Los dominios oxigenasa y reductasa están enlazados por una secuencia de unión a calmodulina (CaM); la unión de CaM facilita la transferencia de electrones del dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa (Cho et al.,

1992) y también aumenta la velocidad de transferencia de electrones a través de las flavinas (Abu-Soud et al., 1994).

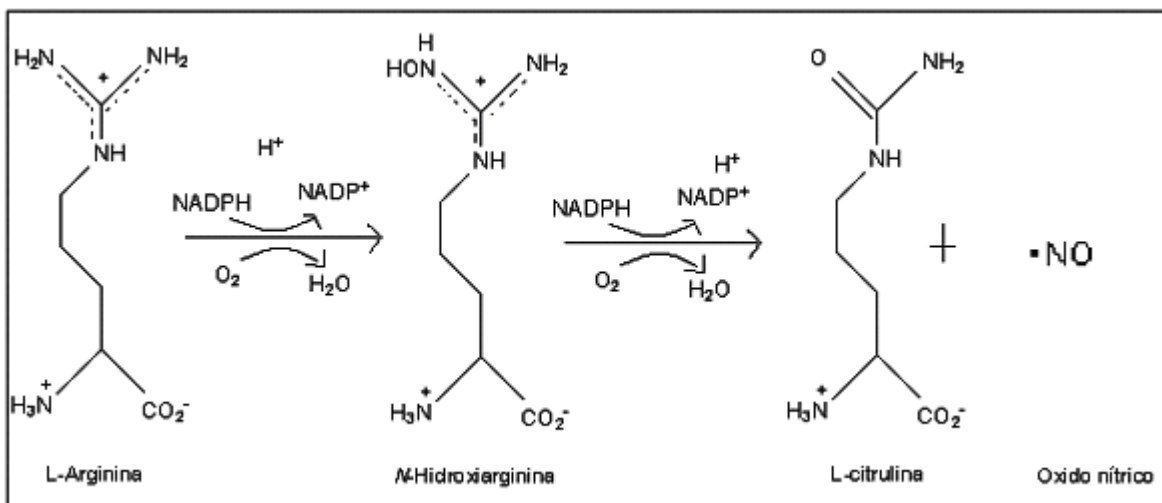


Figura 3. Síntesis de óxido nítrico por las enzimas óxido nítrico sintasas.

Las actividades de las NOSe y la NOSn son reguladas por la unión de calmodulina, la cual a su vez es controlada por los niveles de calcio intracelular inducidos por agonistas y es mediada por una secuencia autoinhibitoria en la región de la FMN en el dominio reductasa. También son directamente reguladas por la síntesis de BH₄ y por otras proteínas a través de la unión directa hacia las NOSs (Matsuda et al., 2000).

3.6 PEROXINITRITO (ONOO⁻)

3.6.1 Formación

La generación simultánea de óxido nítrico (NO) y superóxido favorecen la producción del anión ONOO⁻ (Fig. 4). (Beckman et al., 1990). La reactividad oxidante del peroxinitrito es mediada con la actividad biológica del radical hidroxilo.

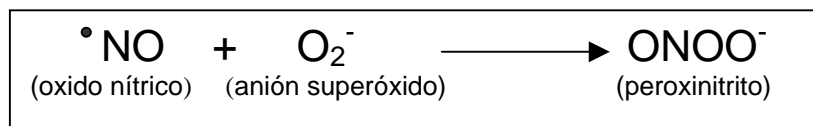


Figura 4. Formación de ONOO⁻

La constante de reacción del óxido nítrico con el anión superóxido es $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. (Radi, 2000). El peroxinitrito está en equilibrio rápido con su forma protonada, el ácido peroxinitroso (ONOOH) (pKa = 6.8). Ambas especies existen in vivo, predominando la forma aniónica a pH 7.4. Tanto la forma aniónica como la protonada del peroxinitrito son capaces de atravesar, por diferentes mecanismos las biomembranas (Denicola et al., 1996).

El peroxinitrito reacciona rápidamente con dióxido de carbono presente en sistemas biológicos conduciendo a la formación de radicales secundarios como radicales carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$). Finalmente, una pequeña fracción de peroxinitrito se homoliza, dando lugar a la formación del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Fig. 5).

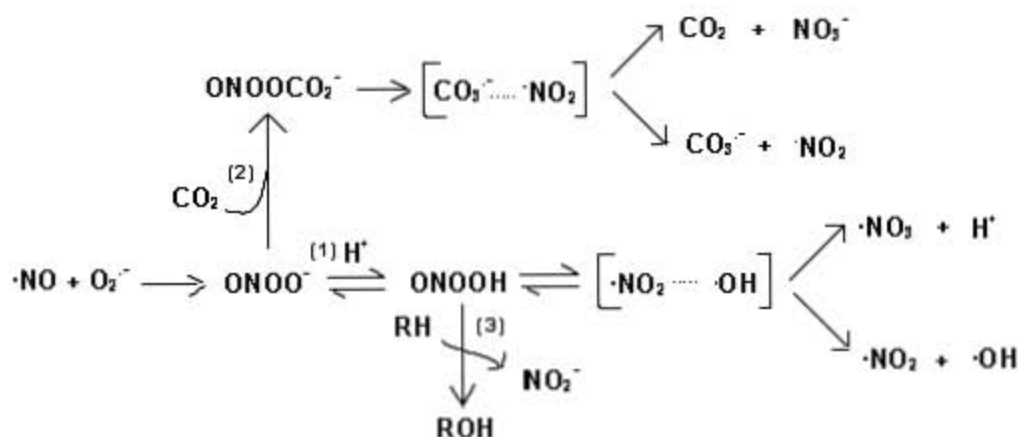


Figura 5. Rutas de formación y descomposición de peroxinitrito en sistemas biológicos. El peroxinitrito es formado por la reacción controlada por difusión de los radicales óxido nítrico y superóxido (Radi, 2000). El peroxinitrito puede formar con el dióxido de carbono el anión nitrosoperoxycarboxilato (ONOOCO_2^-), un aducto transitorio (2) (Denicola et al., 1996), para luego formar anión carbonato y dióxido de nitrógeno o dióxido de carbono y nitratos (Bonini et al., 1999; Goldstein y Czaoski, 1998; Lehnig, 1999). El ácido peroxinitroso puede oxidar directamente sustratos (3) o descomponerse en una ruptura homolítica a radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y ($\cdot\text{NO}_2$). Los procesos de nitración (adición de un grupo nitró NO_2 a una molécula) involucran las reacciones de $\cdot\text{NO}_2$ con las moléculas blanco.

3.6.2 Toxicidad

El peroxinitrito es particularmente efectivo oxidando moléculas aromáticas y compuestos organosulfurados, incluyendo aminoácidos libres y residuos peptídicos. La cisteína y el glutatión son compuestos significativos de reservorios de antioxidantes y estos son convertidos a disulfuros (Szabo et al., 2002). En sistemas in vitro el peroxinitrito es muy reactivo, se encuentra reportado dentro de su actividad la rápida oxidación de grupos sulfhidrilos y tioésteres, la nitración e hidroxilación de compuestos aromáticos, incluyendo la tirosina, el triptofano y la guanina.

Varias reacciones del peroxinitrito ocurren cuando el peroxinitrito reacciona con enzimas, macromoléculas y lípidos, mostrando así influencia sobre funciones celulares. En primera instancia, la nitración de tirosina puede llevar a la disfunción de las proteínas nitradas como se ha sugerido en el caso de la superóxido dismutasa, la tirosina hidroxilasa neuronal, el citocromo P450 y la prostaciclina sintasa (Greenacre e Ischiropoulos, 2001). La oxidación de grupos sulfhidrilos es responsable de la inhibición mitocondrial, de la aconitasa citosólica y de otras enzimas críticas en la cadena respiratoria mitocondrial (Hausladen y Fridovich, 1994). Mientras la reacción con grupos sulfhidrilos es directa con el ONOO^- , la nitración de tirosina probablemente esté asociada con la formación del catión nitrosonio (NO_2^+) intermediario.

La mitocondria representa un blanco preferencial de las acciones tóxicas del peroxinitrito. Experimentos iniciales (Radi et al., 1994) mostraron que el peroxinitrito afecta varios componentes de la cadena de transporte mitocondrial y de la síntesis de ATP y la enzima ferro-sulfurada del ciclo de Krebs aconitasa, llevando a una inhibición de la respiración y una caída de la síntesis de ATP. Estos efectos a su vez tienen un impacto sobre la homeostasis mitocondrial y celular del calcio. Además la interacción del peroxinitrito con las mitocondrias puede determinar la señalización de procesos de muerte celular programada (apoptosis).

Es importante resaltar que el ONOO^- puede inhibir a la superóxido dismutasa (Ischiropoulos et al., 1992; Yamakura et al., 1998), la glutarredoxina (Aykac-Toker et al., 2001) y otras moléculas y sistemas antioxidantes como el glutatión (Cuzzocrea et al.,

1998). El ONOO⁻ también puede ocasionar daño a nivel genético por rupturas y desaminación del ADN (Fig. 5) (Rojas-Walker et al., 1995).

Tabla 4. Procesos citotóxicos iniciados por peroxinitrito (Szabo et al., 2002).

Acción	Mecanismo
<ul style="list-style-type: none"> • <i>A nivel molecular</i> Inhibición de enzimas citosólicas. Inhibición de bombas de membrana. Inhibición de enzimas antioxidantes. Alteraciones en la transducción de señales. Daño al ADN Activación de metaloproteinasas. Agotamiento de enzimas antioxidantes Inhibición de enzimas dependientes de BH ₄ . Inhibición de enzimas dependientes de NAD ⁺ .	Oxidación, nitración Oxidación, nitración Oxidación, nitración Oxidación, nitración Oxidación, nitración, desaminación, formación de aductos. S-glutoxidación de pro-metaloproteinasas. Oxidación de glutatión y de cisteína. Oxidación de BH ₄ Oxidación de NADH.
<ul style="list-style-type: none"> • <i>A nivel subcelular</i> Disfunción de la mitocondria. Agotamiento de NAD ⁺ . Sobre regulación de receptores de adhesión. Fragmentación de ADN. Deficiente regulación de calcio.	Inhibición de citocromos. Activación de PARP, oxidación directa de NAD ⁺ . Activación de NF-κB Daño al ADN, activación de caspasas. Deficiente funcionamiento de las bombas de calcio.
<ul style="list-style-type: none"> • <i>A nivel celular</i> Necrosis. Apoptosis.	Daño mitocondrial, colapso energético, oxidación, nitración, agotamiento antioxidante, deficiente regulación de calcio. Daño mitocondrial, daño al DNA, activación de caspasas, disturbios en las señales de transducción, deficiente regulación de calcio.

La reacción del peroxinitrito con los lípidos lleva a la peroxidación (malondialdehído y formación de dienos conjugados) y la formación del nitro- nitroperoxo- y/o oxidación de aductos de lípidos nitrados (Rubbo et al., 1994).

La nitración de residuos de tirosina es considerada como un marcador bioquímico de la producción de OONO^- in vitro e in vivo (Beckman et al., 1994). La detección de 3-nitrotirosina se ha establecido como un marcador del incremento de la nitración de tirosina en una gran variedad de enfermedades (Greenacre e Ischiroropoulos, 2001).

3.7 METALOPORFIRINAS

3.7.1 Generalidades

Se han descrito un conjunto de metaloporfirinas que catalizan la descomposición de ONOO^- , entre estas tenemos al FeTMS, FeTPPS, FeTMPyP, MnTBAP, MnTMPyP, etc. Las porfirinas de Mn(II) y Fe(III) muestran efectividad a bajas concentraciones, sin embargo, dependiendo del mecanismo de reacción, los atrapadores catalíticos pueden no apagar o detener efectivamente a los intermediarios reactivos, por lo que requieren de compuestos celulares para ser regenerados; típicamente de antioxidantes como el ascorbato y el glutatión (Crow, 2000).

En los últimos años se ha descrito la gran afinidad del ONOO^- por los metales de transición. La primera indicación de que interactuaba con el Fe del grupo hemo aparece en 1993 cuando Floris et al. reportaron una constante de $6.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para la reacción de ONOO^- con la mieloperoxidasa a un pH de 7.2. En 1996, Stern et al. reportaron que el FeTMPyP descompone el ONOO^- a nitrato; en el mismo año Szabo et al. reportaron que el MnTBAP inhibe la oxidación mediada por el ONOO^- in vitro y que además previene de la inhibición de la respiración mitocondrial en células expuestas a ONOO^- .

3.7.2 Mecanismos de acción

Las porfirinas de Mn(III) son diferentes de las de Fe(III) en los agentes reductores que utilizan. El ascorbato es necesario para reducir Mn(IV)=O (el cual es un intermediario de la reacción entre el ONOO^- y la porfirina de Mn(III)) a Mn(IV) y de esta manera completar el ciclo (Fig. 6).

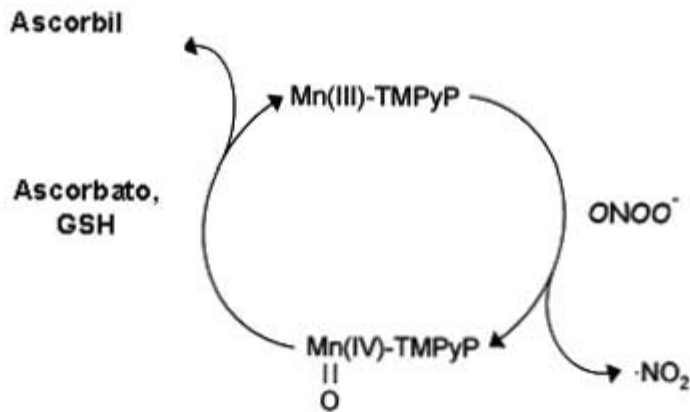


Figura 6. Mecanismo propuesto para las porfirinas de Mn(III) (Crow, 2000).

Por otra parte las porfirinas de Fe(III) pueden descomponer el ONOO⁻ de manera catalítica, sin agentes reductores. La reacción entre el ONOO⁻ y la porfirina de Fe(III) forma el oxoFe(IV); las porfirinas de Fe(III) descomponen el ONOO⁻ a NO₃⁻ en mayor proporción tal y como se muestra en la Fig. 7.

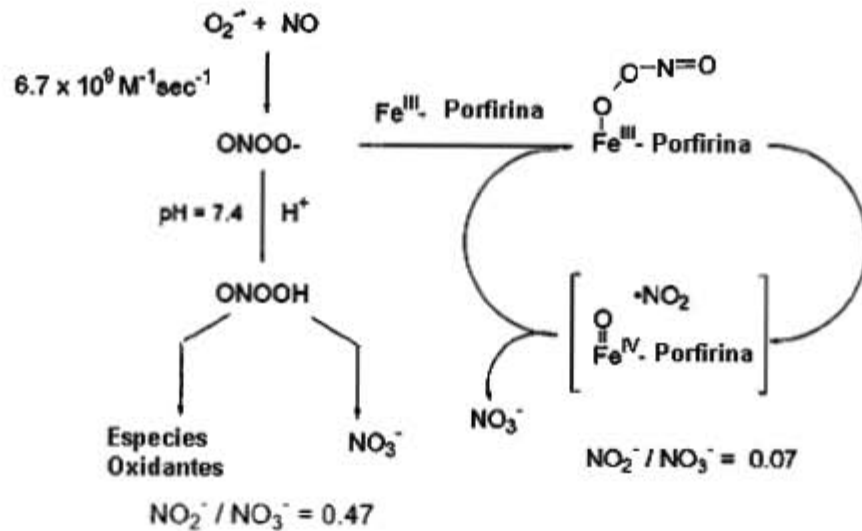
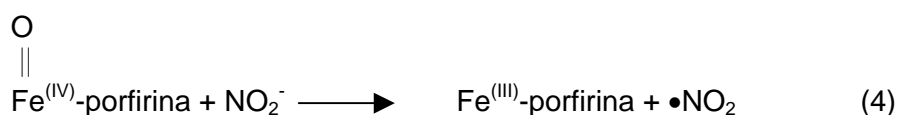
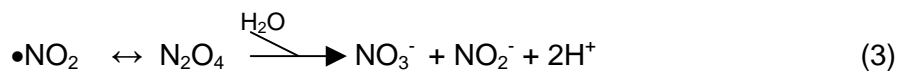
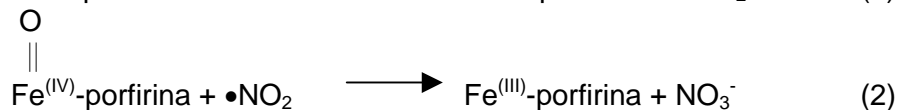
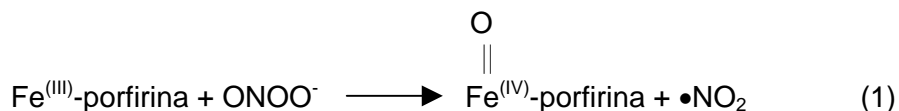


Figura 7. Mecanismo de la descomposición de ONOO⁻ por porfirinas de Fe(III) (Salvemini et al, 1998).

Las siguientes reacciones muestran la forma en que la porfirina de Fe(III) al reaccionar con el peroxinitrito forma un intermediario oxoFe(IV) (1) el cual se puede reducir al reaccionar con el •NO₂ (2) o con el NO₂⁻ (4) y formar nitrato. Cuando el oxoFe(IV) reacciona con el •NO₂ libre es muy rápido comparado con el NO₂⁻. El •NO₂ esta en

constante equilibrio con el N_2O_4 (3), el cual es una fuente de NO_2^- y NO_3^- (Shimanovich y Groves, 2001).



3.7.3 5,10,15,20-tetrakis (4'-fenilsulfonato) porfirinato de Fe(III) (FeTPPS)

El FeTPPS es un poderoso catalizador de la descomposición de peroxinitrito, es soluble en agua y funciona catalizando la isomerización de $ONOO^-$ exclusivamente a nitrato (Stern et al., 1996). También se ha determinado que juega un papel muy importante en inflamaciones agudas (Salvemini et al., 1998) y que tiene efecto protector frente al $ONOO^-$ generado endógenamente en células RAW 264.7 y en cultivos de neuronas hipocampales expuestas a citocinas (Misko et al., 1998).

El FeTPPS ha sido utilizado en un modelo neurotóxico inducido por meta-anfetamina en el cual resultó ser totalmente protector contra la producción de peroxinitrito y contra la depleción dopaminérgica inducida por la meta-anfetamina (Imam et al., 2000).

4. HIPOTESIS

Dado que el QUIN es un conocido agente prooxidante, y que esta característica se debe parcialmente a la formación de peroxinitrito, postulamos que el empleo de un catalizador de la descomposición de peroxinitrito, como el FeTPPS, atenuará o prevendrá el daño neurotóxico inducido por el QUIN en el estriado de ratas.

5. OBJETIVO

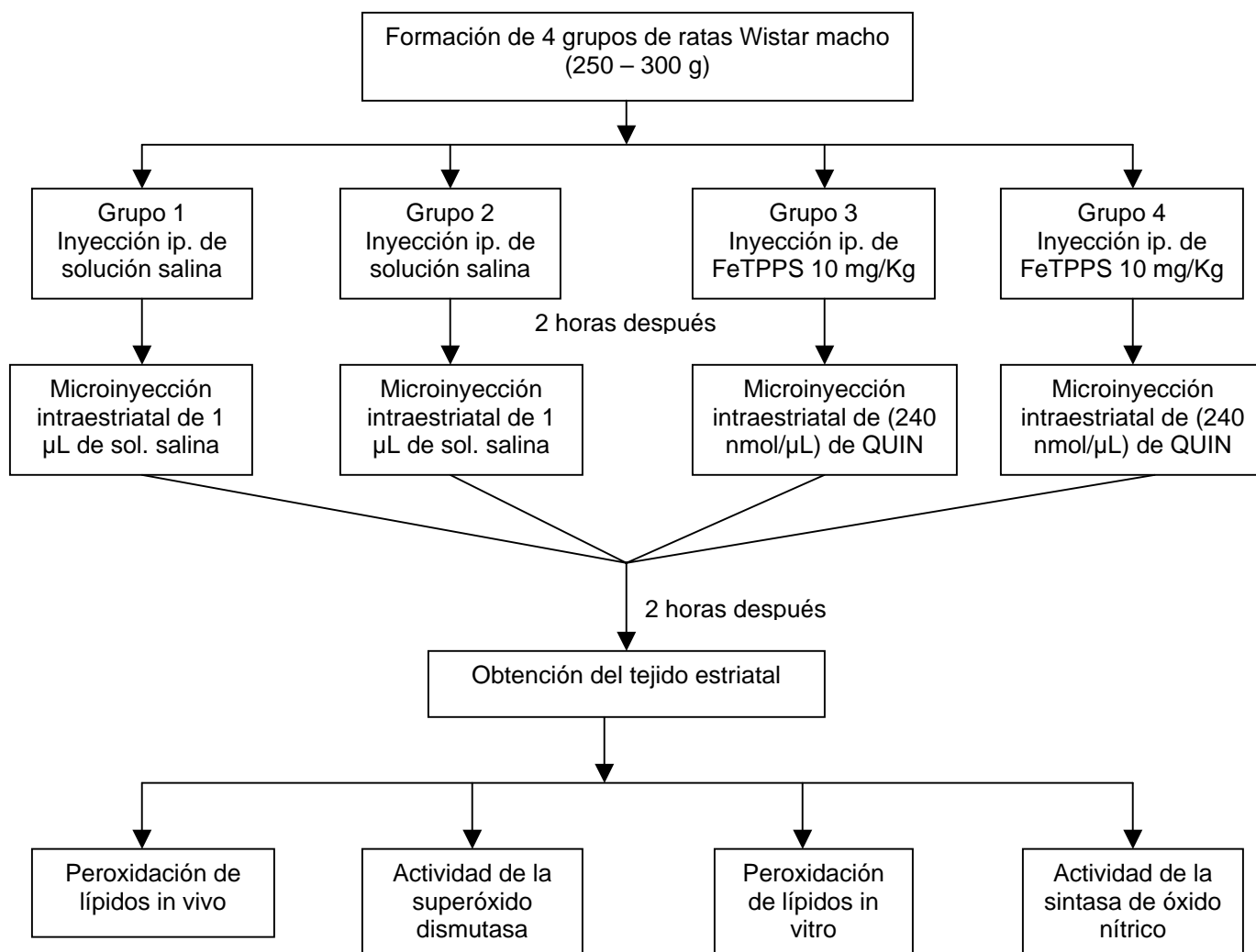
- ❖ Evaluar si la infusión estriatal de QUIN y su consecuente neurotoxicidad están relacionadas con la formación de ONOO^- .
- ❖ Determinar si el patrón de neurotoxicidad evocado por el QUIN puede ser modulado por el catalizador de la descomposición de ONOO^- , el FeTPPS.

6. MATERIALES Y METODOS

Para realizar esta investigación se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (270-300 g) del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Los animales se mantuvieron a una temperatura constante (20-25°C), con un ciclo de luz normal y con libre acceso a comida y agua.

Se utilizó agua bidestilada para la preparación de todos los reactivos y soluciones.

6.1 Diagrama de flujo



6.2 Pretratamiento de los animales con FeTPPS e inyección intraestriatal con QUIN

Se diseñaron 4 grupos experimentales de seis animales cada uno: 1) solución salina intraperitoneal (i.p.) + solución salina intraestriatal (i.e.); 2) FeTPPS (i.p.) + solución salina (i.e.); 3) solución salina (i.p.) + QUIN (i.e.); 4) FeTPPS (i.p.) + QUIN (i.e.). La solución administrada por vía intraperitoneal fue administrada dos horas antes de la inyección intraestriatal. La concentración de FeTPPS administrada fue de 10 mg/kg de peso del animal. Transcurridas las dos horas las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (0.2 ml/250 g de peso) e inyectadas unilateral y estereotáxicamente (coordinadas de acuerdo al Atlas esterotáxico de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998) en el estriado derecho (caudado/putamen) con solución salina (pH 7.4) ó QUIN (240 nmol/ μ l, pH 7.4), según el grupo de tratamiento. La inyección en estriado se realizó en un lapso de 2 min. y se mantuvo la aguja en la zona de lesión por 2 min. más para permitir la adecuada difusión de la solución inyectada.

6.3 Obtención de sinaptosomas

1. Decapitar a las ratas y obtener el cerebro completo.
2. Pesar los cerebros y ponerlos en un homogenizador.
3. Agregar 37 mL solución de glucosa 0.32 M.
4. Homogenizar.
5. Centrifugar a 1073 x g durante 10 min.
6. Obtener el sobrenadante y centrifugar a 17172 x g por 15 min
7. Resuspender el precipitado en 37mL de HEPES (NaCl 0.1 M, NaH₂PO₄ 0.001 M, NaHCO₃ 0.005 M, CaCl₂ 0.001 M, HEPES 0.01 M) pH=7.4
8. Estandarizar a 300 μ g/mL de proteína.
9. Guardar a – 70°C.

6.4 Peroxidación de lípidos

6.4.1 Método fluorométrico (en tejido estriatal)

Se desarrolló este método dos horas después de la inyección estriatal de ácido QUIN a las ratas; utilizando el método fluorométrico de detección de productos de peroxidación modificado por Santamaría y Ríos (1993). Los pasos a seguir para la determinación de productos fluorescentes derivados de la peroxidación son los siguientes:

1. Pesar y homogenizar en 3 mL de solución salina isotónica, con un homogenizador de vidrio con brazo de teflón
2. Transferir un mililitro del homogenizado a un tubo de vidrio y adicionar 4 mL de una mezcla cloroformo: metanol (2:1 v/v). Mezclar en un vortex por 60 seg.
3. Dejar reposar los tubos en hielo durante 45 minutos protegidos de la luz.
4. Desechar la fase lipídica.
5. Medir fluorescencia de cada muestra en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B, a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 430 nm.
6. Ajustar la sensibilidad del espectrofotómetro se ajusta previamente a 300 unidades con un estándar fluorescente de quinina (0.1 $\mu\text{g/mL}$) en ácido sulfúrico 0.05 M.
7. Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia/g de tejido fresco.

6.4.2 Método fluorométrico (en sinaptosomas)

1. Adicionar 500 μL de la solución estandarizada de sinaptosomas a un tubo Eppendorf.
2. Preparar en tubos Eppendorf diferentes concentraciones de FeTPPS y MnTBAP (0 a 750 μM) de acuerdo a la siguiente tabla:

Concentración	Vol. de la solución	Vol. de ácido	Vol. de	Vol. de
---------------	---------------------	---------------	---------	---------

de FeTPPS (μM)	estandarizada de sinaptosomas (μL)	Quinolínico 100 μM (μL)	FeTPPS 2 mM (μL)	HEPES pH=7.4 (μL)
Control	500	----	----	500
0	500	50	----	450
10	500	50	5	445
25	500	50	12.5	437
50	500	50	25	425
75	500	50	37.5	462
100	500	50	50	400
250	500	50	125	325
350	500	50	175	275
500	500	50	250	200
750	500	50	375	75

Realizar esta parte por duplicado en un baño con hielo.

3. Incubar las muestras a 37°C durante 60 min.
4. Sacar los tubos y agregar 3 mL de una mezcla cloroformo: metanol (2:1 v/v). Agitar en un vortex por 60 seg.
5. Dejar reposar los tubos en hielo protegidos de la luz durante 45 minutos para que se lleve a cabo la extracción.
6. Desechar la fase metanólica.
7. Medir la fluorescencia de cada muestra en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B, a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 430 nm.
8. Ajustar la sensibilidad del espectrofotómetro a 300 unidades con un estándar fluorescente de quinina (0.1 μ g/mL) en ácido sulfúrico 0.05 M.
9. Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia / mg de proteína.

6.5 Determinación de proteínas

Se determino por el método de Lowry (Lowry et al.,1951).

1. Preparar una curva estándar, partiendo de una solución de albúmina al 0.05%, de acuerdo a la siguiente tabla:

Concentración ($\mu\text{g}/0.2\text{mL}$)	Volumen de albúmina 0.05% (μL)	H ₂ O (μL)
Blanco	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
25	50	150
35	70	130
50	100	100

2. Colocar en cada tubo 200 μL de la dilución 1:100 del estriado homogenado.
3. Añadir a todos los tubos 1 mL de una mezcla de $\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.05%, Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4% y tartrato de sodio 0.02% (incluyendo los tubos de la curva estándar y el blanco).
4. Agitar y esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir a todos los tubos 100 μL del reactivo de Folín al 50%, (con agitación simultanea).
6. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Leer la absorbencia a 550 nm.
8. Calibrar contra el blanco.

6.6 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se mide por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley et al., 1984)

1. En cada muestra se utilizan dos tubos problema y un tubo blanco; además considerar 4 tubos adicionales: 2 al principio de la serie y 2 al final de la misma. Estos 4 tubos son los tubos del 100% de reducción.
2. Preparar la mezcla de reacción (sustratos de SOD) dependiendo del número de muestras que se tengan.

Sustrato	Concentración final
Xantina	0.122 mM
EDTA	0.122 mM
NBT	30.6 μ M
Albúmina	0.0006%
Na ₂ CO ₃	49 mM

3. Los tubos 100% llevan mezcla de reacción, amortiguador y xantina oxidasa.
Los tubos blanco de muestra llevan mezcla de reacción, muestra y amortiguador.
Los tubos problema llevan mezcla de reacción, muestra y xantina oxidasa.
 4. Adicionar a cada tubo 830 μ L de la mezcla de reacción.
 5. Incubar los tubos a 27°C
 6. Elegir un intervalo para la adición de 165 μ L de amortiguador o de muestra (agitar en el vórtex después de cada adición).
 7. Inmediatamente adicionar 33 μ L de amortiguador o de xantina oxidasa.
 8. El tiempo de incubación será de 15 min.
 9. Adicionar 330 μ L de CuCl₂ 0.8 mM de tal manera que cada tubo de reacción tenga 15 min. de incubación.
 10. Calibrar con la mezcla de reacción y leer la absorbencia de cada tubo a 560 nm.
- Nota: todo se realiza por duplicado. Es necesario medir la concentración de proteínas totales para calcular la actividad específica de esta enzima.

6.7 Determinación de la actividad de la sintasa de óxido nítrico

La participación del NO en el daño oxidativo fue analizada indirectamente mediante la técnica desarrollada por Bredt y Snyder, en 1990, modificada por Pérez-Severiano et al. (1998), en la cual se mide la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS), tanto la dependiente como la independiente de Ca^{2+} evaluando la conversión estequiométrica de $[\text{}^3\text{H}]\text{-L-arginina}$ a $[\text{}^3\text{H}]\text{-L-citrulina}$ más NO.

- Preparación de la mezcla de inhibidores de proteasas: leupeptina (1 mg/2 mL), Inhibidor de tripsina (SBTI) (1 mg/mL), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (17.4 mg/mL), aprotinina (2 mg/mL), Nonidet P-40 (NP40) al 0.1%.

1. Agregar a cada muestra 250 μL de la mezcla de inhibidores.
2. Homogenizar en un homogenizador de vidrio con brazo de teflón.
3. Medir proteínas por el método de Lowry descrito anteriormente.
4. La enzima contenida en 500 μg de proteína se incubó durante 30 minutos a 37°C en presencia de los siguientes cofactores (todos a concentraciones finales): L-arg (10 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$), NADPH (1 mmol / 100 μl), calmodulina (100 nmol/100 μl), BH_4 (30 $\mu\text{mol}/100\mu\text{l}$), $\text{H}^3\text{-L-arg}$ (0.2 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$). Los volúmenes finales de reacción fueron ajustados a 100 μl con amortiguador de homogeneización (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA. 0.1 mM EGTA, 0.1% β -mercaptoetanol, pH 7.5). Los volúmenes finales de reacción fueron ajustados a 100 μL .

	Muestra	L-arg (μL)	L-arg 3H (μL)	CaCl_2 (μL)	EGTA/EDTA (μL)	NADPH (μL)	CaM (μL)	BH4 (μL)
Calcio	1	1	5	10	***	2.5	1	3
EGTA/EDTA	1	1	5	***	10	2.5	1	3
L-NAME	1	1	5	10	***	2.5	1	3
Calcio	2	1	5	10	***	2.5	1	3
EGTA/EDTA	2	1	5	***	10	2.5	1	3
L-NAME	2	1	5	10	***	2.5	1	3

5. Pasado el tiempo de incubación, detener la reacción adicionando 1 ml de una solución amortiguadora de paro (2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH=5.5).

6. La mezcla de reacción es transferida a una columna conteniendo 1 ml de resina Dowex-50W, previamente equilibrada con una solución de NaOH 1 N.
7. Dejar eluir.
8. Agregar al líquido eluyente 5 mL del líquido de centelleo para su cuantificación en un contador de radiactividad.
9. Los resultados se reportan en ng de L-citrulina/mg de proteína/30 min

6.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA simple seguido por una prueba de Turkey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. Los datos se expresaron como $\bar{X} \pm$ error estándar de la media (EEM).

7. RESULTADOS

7.1 Actividad de superóxido dismutasa

En la Fig. 8 se muestra el efecto del QUIN y del FeTPPS sobre la actividad de SOD comparada con el grupo control. Se observa que QUIN disminuye la actividad de SOD. El FeTPPS solo, no tuvo efecto significativo sobre la actividad de esta enzima. La administración de FeTPPS al grupo de QUIN (FeTPPS+QUIN) no solo previene la disminución de SOD sino que la aumenta significativamente con respecto al control.

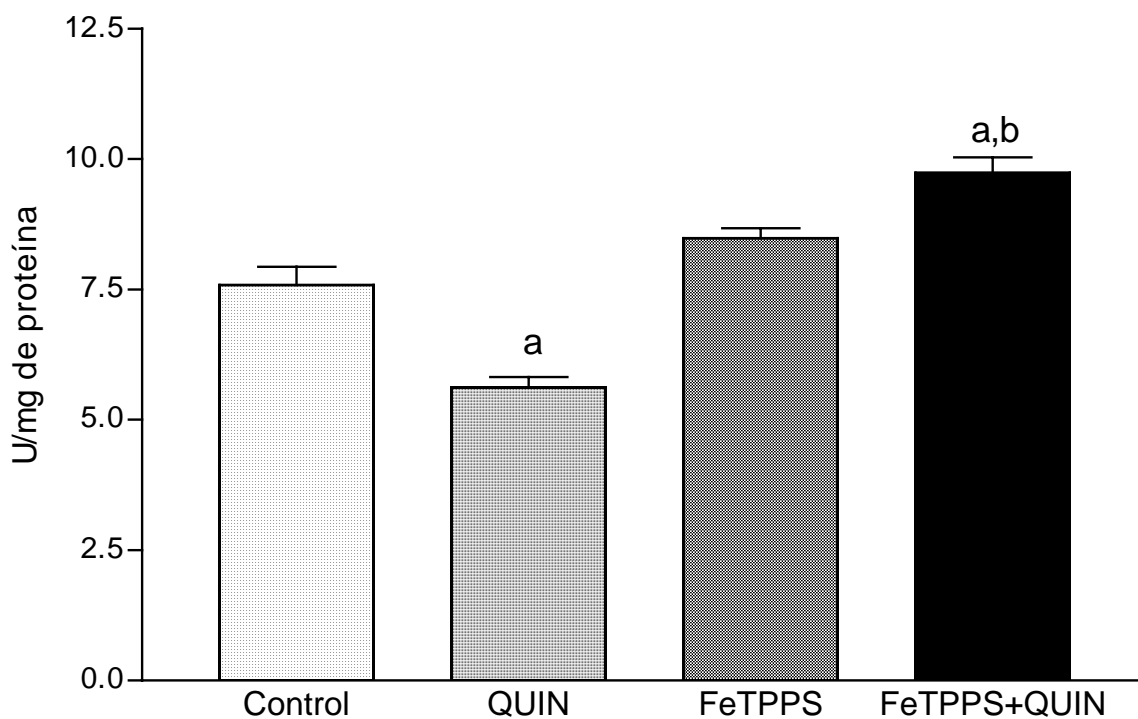


Fig. 8. Efecto del QUIN y FeTPPS sobre la actividad de SOD.

El FeTPPS fue administrado 2 horas antes de la lesión intraestriatal con QUIN y dos horas después de la lesión se obtuvo la muestra. El número de animales tratados fue 6 para cada grupo. ^ap<0.01 vs control, ^bp<0.01 vs QUIN.

7.2 Peroxidación de lípidos en tejido estriatal

En los productos de peroxidación lipídica en estriado que se muestran en la Fig. 9 se observa un incremento de lipoperoxidación inducida por QUIN con respecto al control. El FeTPPS solo no produce cambios significativos con respecto al control; mientras que el efecto del FETPPS disminuye totalmente la peroxidación inducida por QUIN.

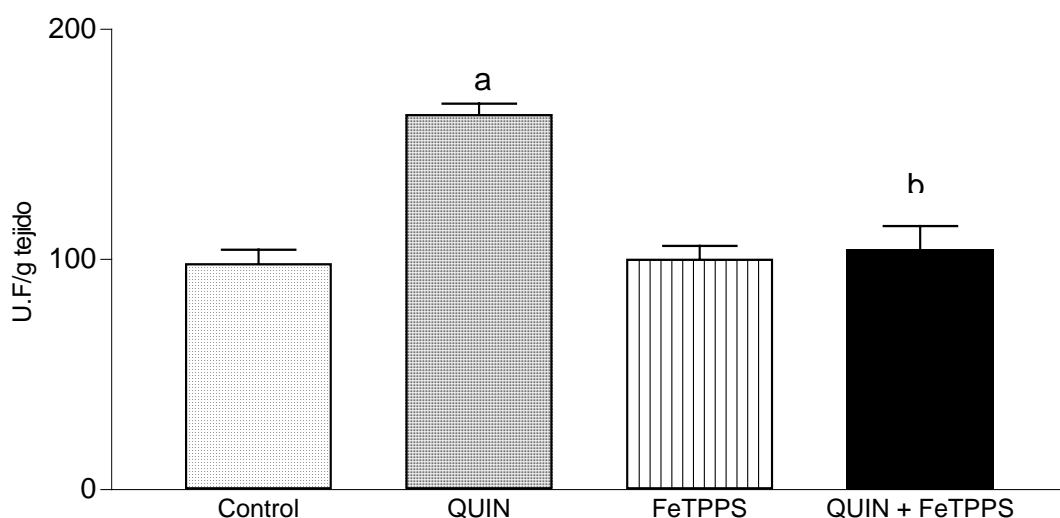


Figura 9. Efecto del QUIN y FeTPPS sobre la peroxidación de lípidos en tejido estriatal. El FeTPPS fue administrado 2 horas antes de la lesión intraestriatal con QUIN, dos horas después de la lesión se obtuvo la muestra. El número de animales tratados fue 6 para cada grupo. ^ap<0.01 vs control, ^bp<0.01 vs QUIN.

7.3 Determinación de la actividad de las sintasas de óxido nítrico

En la Fig. 10 se observa un incremento en la actividad de la sintasa de óxido nítrico constitutiva (NOSn + NOSe) inducida por QUIN. El QUIN no muestra cambios significativos en la sintasa de óxido nítrico inducible. El FeTPPS solo, no muestra cambios significativos con respecto al control. La administración de FeTPPS al grupo de QUIN (FeTPPS+QUIN) disminuye la actividad de la sintasa de óxido nítrico tanto la constitutiva como la inducible.

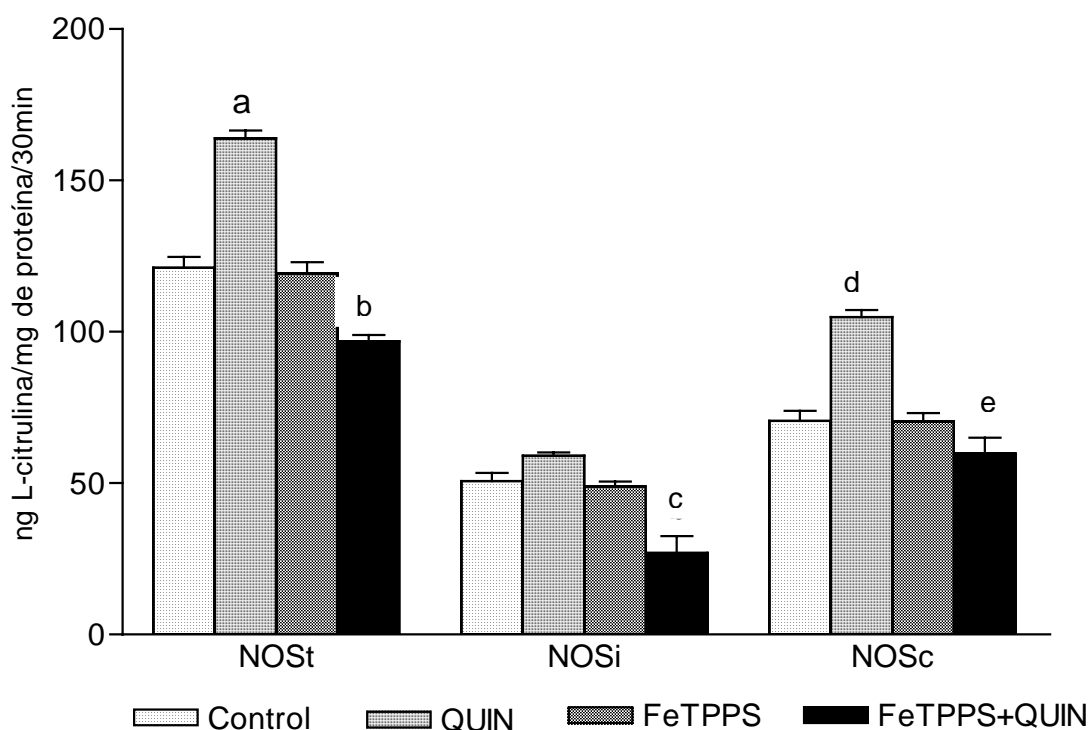


Figura 10. Efecto de QUIN y FeTPPS sobre la actividad de la sintasas de óxido nítrico. El FeTPPS fue administrado 2 horas antes de la lesión intraestriatal con QUIN, dos horas después de la lesión se obtuvo la muestra. El número de animales tratados fue 6 para cada grupo. ^ap<0.01 vs control, ^bp<0.01 vs QUIN, ^cp<0.05 vs control, ^dp<0.05 vs control, ^ep<0.01 vs QUIN.

7.4 Peroxidación lipídica in vitro a diferentes concentraciones de las porfirinas: FeTPPS y MnTBAP

En la Fig. 11 observamos que el QUIN es capaz de aumentar la peroxidación lipídica en sinaptosomas a una concentración 100 μM . Al agregar las diferentes concentraciones de FeTPPS y de MnTBAP observamos como desde la menor concentración (10 μM) se ve un cambio significativo con respecto al QUIN y así se mantienen en todas las demás concentraciones.

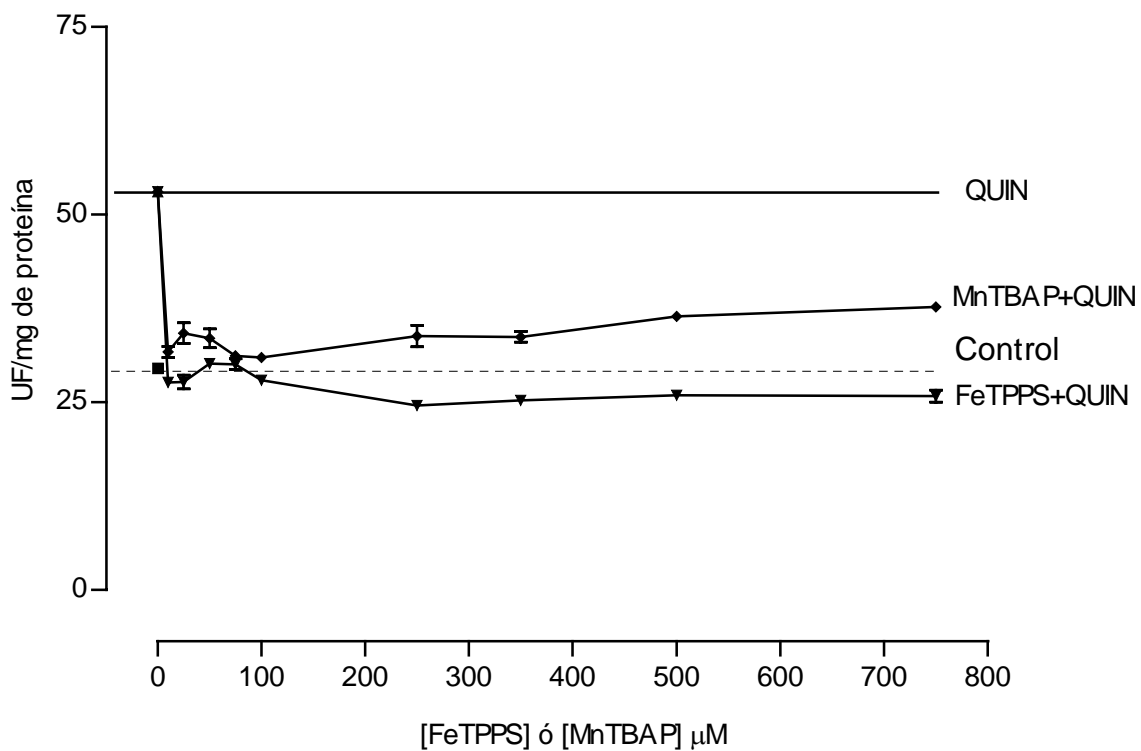


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de FeTPPS y MnTBAP sobre la peroxidación de lípidos inducida por QUIN (100 μM), en sinaptosomas. QUIN diferente de Control, $p < 0.01$. * $p < 0.01$ vs QUIN.

8. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio nos indican que el FeTPPS tiene efectos protectores contra la neurotoxicidad inducida por QUIN en el cuerpo estriado de la rata. Estos datos concuerdan con la información del efecto protector del FeTPPS en otros modelos experimentales como en inflamaciones agudas (Salvemini et al., 1998), en modelos neurotóxicos inducidos por meta-anfetamina (Imam et al., 2000), en cultivos de neuronas hipocampales expuestas a citocinas (Misko et al., 1998), entre otros. Son interesantes las acciones observadas en los diferentes marcadores de neurotoxicidad inducida por QUIN, implicando así el amplio espectro de neuroprotección mediada por el FeTPPS.

El FeTPPS es una metaloporfirina catalizadora de la descomposición de ONOO^- . Los efectos excitotóxicos y oxidantes del QUIN están documentados extensamente. El QUIN es un agonista de receptores NMDA (Shwarcz et al., 1984; Stone, 1993) y es de carácter excitotóxico ya que demuestra efectos tóxicos en el sistema nervioso central. La potencia oxidativa del QUIN, la susceptibilidad de acciones oxidativas sobre el cerebro y antioxidantes y la habilidad que tiene de afectar sistemas antioxidantes endógenos, está bien documentada (Ríos y Santamaría, 1991; Stípek et al., 1997; Santamaría et al., 2001, 2003). Este hecho sugiere que una fracción de la toxicidad de QUIN quizá sea independiente de los receptores NMDA y esta fracción dependa del hierro, ya que se puede dar la formación de un complejo de Fe-QUIN.

En este trabajo encontramos que el QUIN disminuye la actividad de SOD, aumenta la actividad de la NOSc y la peroxidación de lípidos; sin embargo al utilizar un compuesto como el FeTPPS estos efectos se abaten. En el intento de explicar estos resultados, puesto que el FeTPPS es un catalizador de ONOO^- , postulamos tres posibles mecanismos por los que posiblemente esté actuando: 1) que el FeTPPS es un catalizador de amplio espectro, es decir que no sólo interviene en la descomposición de ONOO^- , sino antes de que este se forme; 2) que el FeTPPS al estar catalizando la descomposición de ONOO^- a nitrato, genere una cantidad menor de radicales libres como el radical hidroxilo y de esta manera protege a las enzimas y son vulnerables al daño oxidativo y 3) que el FeTPPS esté forme un complejo con el QUIN y de esta manera esté impidiendo la sobreactivación de receptores NMDA, tal como lo muestra la figura 12.

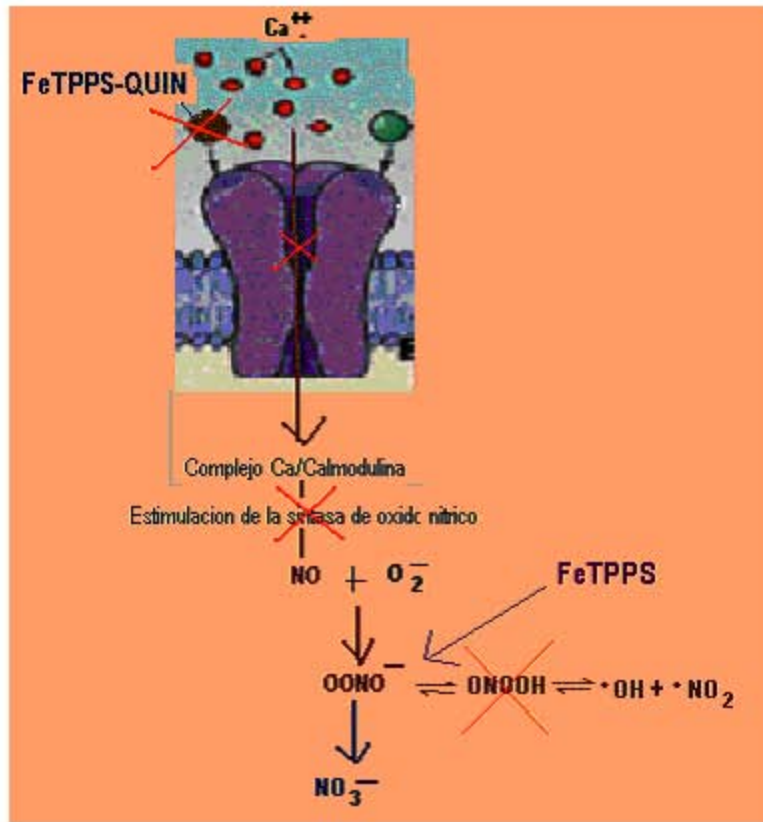


Figura 12. Posibles mecanismos por los que actúa el FeTPPS

Estos resultados así como sus posibles mecanismos sugieren realizar experimentos adicionales para esclarecer cual es el mecanismo real por el cual el FeTPPS protege del daño inducido por QUIN. Sin embargo hay que tomar en cuenta, que parte del daño causado por QUIN se debe al peroxinitrito y esto lo podemos corroborar ya que la utilización de un ensayo inmunohistoquímico de 3-nitrotirosina como biomarcador de la presencia de ONOO⁻ resulta positivo (Santiago-López et al., 2004).

Nuestros resultados *in vivo* son de gran importancia ya que evidencian lo que está pasando a las dos horas de haber inyectado intraestriamente el QUIN, es decir antes de que se desencadenen otro tipo de mecanismos.

Por otra parte también se demostró que tanto el MnTBAP como el FeTPPS mostraron efecto protector desde la concentración de 10 µM sobre la peroxidación de lípidos inducida por QUIN (100 µM) en los sinaptosomas de cerebro de rata lo cual nos indica la potencia y efecto protector de estas porfirinas *in vitro*.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- ❖ El FeTPPS (10 mg/kg) disminuyó la peroxidación de lípidos inducida por QUIN *in vivo*. Esto sugiere que parte del daño causado por QUIN se debe a la presencia de ONOO⁻.
- ❖ El FeTPPS previno la disminución de la actividad de SOD y el aumento de la actividad de NOSc inducidos por QUIN.
- ❖ El FeTPPS y el MnTBAP atenuaron el daño oxidativo inducido por el QUIN en sinaptosomas de rata.

1. CONCLUSIÓN

- ❖ Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el FeTPPS no sólo protege debido a la descomposición de peroxinitrito a nitrato, sino al bloqueo de la activación de las sintasas de óxido nítrico y de la disminución de la actividad de superóxido dismutasa.

11. PERSPECTIVAS

- ❖ Se considera la necesidad de realizar estudios más detallados para adquirir un conocimiento más profundo acerca de los mecanismos por los cuales el FeTPPS ejerce su protección en el modelo de neurotoxicidad inducida por QUIN, entre los cuales destacan:
 - Determinación inmunohistoquímica de 3-nitrotirosina debido a que actualmente es considerada como un biomarcador de especies reactivas de nitrógeno.
 - Detección de niveles estriatales de ácido γ -aminobutírico (GABA) y evaluación de la conducta de rotación, debido a que estos son parámetros de neurotoxicidad en el modelo de QUIN.

12. BIBLIOGRAFIA

- Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ. 1994. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra-interdomain electron transfer. *J Biol Chem* 269:32047-32050.
- Aikens J, Dix TA. 1991. Peroxy radical (HOO •) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 266:15091-15098.
- Aykac-Toker G, Bulgurcuoglu S, Kocak-Toker N. 2001. Effect of peroxynitrite on glutaredoxin. *Hum Exp Toxicol* 20:373-376.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 77:658-666.
- Beal MF, Kowall NE, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth Enzymol* 223:229-240.
- Block F, Kunkel M, Schwarcz M. 1993 Quinolinic acid lesion of the stratum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci Lett* 149:126-128.
- Bogdanov MB, Wurtman RJ. 1997. Possible involvement nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 221:197-201.
- Bonini MG, Radi R, Ferrer-Sueta G, Ferreria AM, Augusto O. 1999. Direct EPR detection of carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J Biol Chem* 274:10802-10806.
- Bret DS, Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:682-685.
- Bruyn RP, Stoof JC. 1990. The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J Neurol Sci* 95:29-38.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 28:327-359.

- Choe M, Jackson C, Yu BP. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med* 18:977-984.
- Choi JH, YU BP. 1995. Brain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity. *Free Radic Biol Med* 18:133-139.
- Crow JP. 2000. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radic Biol Med* 28:1487-1494.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'conor M, Salman A, Szabo C. 1998. Effect of L-buthionine-(S, R)Sulphoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite and endotoxic shock-induced vascular failure. *Br J Pharmacol* 123:525-537.
- Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderck KM, Lee TD, Nathan C. 1992. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176:599-604.
- Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. 1996. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* 333:49-58.
- During MJ, Heyes MP, Freese A, Markey SP, Martin JB, Roth RH. 1989. Quinolinic acid concentrations in striatal extracellular fluid reach potentially neurotoxic levels following systemic L-tryptophan loading. *Brain Res* 476: 384-387.
- Floris R, Piersma SR, Yang G, Jones P, Wever R. 1993. Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur J Biochem* 215:767-775.
- Foster AC, Collins JF, Schwarcz R. 1983. On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology* 22:1331-1342.
- Frei B, Stocker R, England L, Ames B. 1990. Ascorbate: the most effective oxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 264:155-163.
- Goda K, Kishimoto H, Shimizu S, Hamane Y, Ueda M. 1996. Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active oxygens during cell death in the brain. *Adv Exp Med Biol* 398:247-254.
- Goldstein S, Cazapski G. 1998. Formation of peroxynitrate from the reaction of peroxynitrite with CO₂: Evidence for carbonate radical production. *J Am Chem Soc* 120:3458-3463.

- Greenacre SA, Ischiropoulos H. 2001. Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34:541-581.
- Griffith OW, Stuehr DJ. 1995. Nitric oxide synthase: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-736.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA. 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked Huntington's disease. *Nature* 306: 234-328.
- Gutteridge JM, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14.
- Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end. *Free Radic Res* 31:261-272.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 2001. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. USA. pp. 36-104.
- Hannan A. 2004. Molecular mediators, environmental modulators and experience-dependent synaptic dysfunction in Huntington's disease. *Acta Biochim Pol* 51:415-430.
- Hantraye P, Richie D, Maziere MY, Isacson O. 1990. A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* 108:91-104.
- Harris CM, Massey V. 1992. The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J Biol Chem* 267:8370-8379.
- Hausladen A, Fridovich I. 1994. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269:29405-29408.
- Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Der Demitrack MAM, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJP, Lackner A, Larsen SA, Lee K, Leonard HL, Markey SP, Martin A, Milstein S, Mouradian MM, Pranzatelli MR, Quearry BJ, Salazar A, Smith M, Strauss SE, Sunderland T, Swedo SW, Tourtellotte WW. 1992. Quinolinic and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 115:1249-1273.
- Horton AA, Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 18:27-79.

- Imam ZS, Islam F, Itzhak Y, Slikker W, Ali FS. 2000. Prevention of dopaminergic neurotoxicity by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the prevention of methamphetamine-induced neurotoxic damage. *Brain Res* 837:15-21.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. 1992. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298:431-437.
- Iwahashi H, Kawamori H, Fukushima K. 1999. Quinolinic acid, α -picolinic acid, fusaric acid, and 2,6-pyridinedicarboxylic acid enhance the Fenton reaction in phosphate buffer. *Chem Biol Interact* 118:201-215.
- Kehrer JP. 2000. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 62:235-6
- Lapin IP. 1978. Stimulant and convulsive effects of kinurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm* 42:37-43.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Foli-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lehnig M. 1999. Radical mechanisms of the decomposition of peroxynitrite and the peroxynitrite-CO(2) adduct and of reactions with L-tyrosine and related compounds as studied by (15) N chemically induced dynamic nuclear polarization. *Arch Biochem Biophys* 368:303-318.
- Matsuda H, Kimura S, Iyanagi T. 2000. One-electron reduction of quinones by the neuronal nitric-oxide synthase reductase domain. *Biochim Biophys Acta* 14:106-116.
- May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by the thioredoxin reductasa. *J Biol Chem* 273:23039-23045.
- Misko PT, Highkin KM, Veenhuizen WA, Manning TP, Stern KM, Currie GM, Salvemini D. 1998. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem* 273:15646-15653.
- Murakami K, Ueda T, Morikawa R, Ito M, Haneda M, Yoshino M. 1998. Antioxidant effect of dipicolinic acid on the metal catalyzed lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biomed Res* 19:205-208.
- Nathan C, Xie Q. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725-13728.
- Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato E. 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 53:2015-2055.
- Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.

- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. 1996. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 75:617-636.
- Pasantés H, Tapía R, Arias C. 2000. Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. Fondo de Cultura Económica. pp. 58-71.
- Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, Ríos C. 1998. Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinic acid-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res* 23:1297-1302.
- Pérez-Severiano F, Ríos C. 2000. Enfermedad de Huntington. Series del Inst. Nac. de Neurología y neurocirugía Manuel Velasco Suárez. pp. 67.
- Powers SK, Lennon SL. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58:10025-1033.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296:295-309.
- Radi R, Rodríguez M, Castro L, Telleri R. 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308:89-95.
- Radi R. 2000. Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. *Actas de Fisiología* 6:123-130.
- Ravikumar A, Deepadevi KV, Arun P, Manojkumar V, Kurup PA. 2000. Tryptophan and tyrosine catabolic pattern in neuropsychiatric disorders. *Neurol India* 48:231-238.
- Rice-Evans C, Burdon R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32:71-110.
- Ríos C, Santamaría A. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* 16:1139-1143.
- Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H. 1995. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8:473-477.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Kikuchi M, Freeman BA. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269:26066-26075.
- Salvemini D, Wang Z, Stern KM, Currie GM, Misko T. 1998. Peroxynitrite decomposition catalysts: Therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Pharmacology* 95:2659-2663.

- Sanberg PR, Calderon SF, Giordano M, Tew JM, Norman AB. 1989. The quinolinic acid model of Huntington's disease: locomotor abnormalities. *Exp Neurol* 105:45-53.
- Santamaría A, Ríos C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett* 159:51-54.
- Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A., Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galvan-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12:2693-2696.
- Santamaría A, Flores-Escartin A, Martínez JC, Osorio L, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Jiménez-Capdeville ME, Manjares J, Ríos C. 2003. Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Radic Biol Med* 35:418-427.
- Santiago-López D, Vázquez-Román B, Pérez de la Cruz V, Barrera D, Rembao D, Salinas-Lara C, Pedraza-Chaverrí J, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A. Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse*, en prensa.
- Sauer H, Warttenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186.
- Schaich KH. 1992. Metals and lipid oxidation. *Lipids* 27:209-218.
- Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219:316-319.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO. 1984. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 35:19-32.
- Schwarcz R, Pellicciari R. 2002. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1-10.
- Shimanovich R, Groves TJ. 2001. Mechanisms of peroxynitrite decomposition catalyzed by FeTMPS, a bioactive sulfonated iron porphyrin. *Arch Biochem Biophys* 387:307-317.
- Stern MK, Jensen MP, Kramer K. 1996. Peroxynitrite decomposition catalysts. *J Am Chem Soc* 118:8735-8736.
- Stípek S, Stastny F, Platenik J, Crkovská J, Zima T. 1997. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem Int* 30:233-237.
- Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45:309-379.

- Stooft B. 1990. The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J Neurol Sci* 95:29-38.
- Stuehr DJ. 1997. Structure – function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339-359.
- Szabo C, Day BJ, Salzman AL. 1996. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 381:82-86.
- Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT. 2002. Part I: pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med* 8:571-580.
- Szabo C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 140:105-112.
- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. 1998. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273:14085-14089.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10:291-316.
- Zentella M, Saldaña Y. 1996. Papel Fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioquímica* 15:152-161.