



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL,
INMUNOHISTOQUÍMICA Y NEUROQUÍMICA DE UN
MODELO DE FACILITACIÓN TÓXICA POR LA
UTILIZACIÓN CONJUNTA DE QUIN Y 3-NP**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DIANA PÉREZ CARRERA



DIRECTOR DE TESIS:

DOCTOR ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Pérez
Carrera
Diana
53 00 96 96
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
404083865

2. Datos del tutor

Santamaría
Del Ángel
Abel

3. Datos del sinodal 1

Cárdenas
Vázquez
René de Jesús

4. Datos del sinodal 2

Camacho
Carranza
Rafael

5. Datos del sinodal 3

Pérez
De la Cruz
Verónica

6. Datos del sinodal 4

Falcón
Rodríguez
Carlos Iván

7. Datos de la tesis

Caracterización conductual, inmunohistoquímica y neuroquímica de un modelo de
facilitación tóxica por la utilización conjunta de QUIN y 3-NP
112 p

DEDICATORIA

Este trabajo es el final de un proceso, del que no fui la única participante. En este proceso aprendí, disfruté, sufrí, tropecé, caí y me levanté, lo cual no hubiera sido posible sin la compañía, cariño y fortaleza de mi familia; ellos fueron, son y serán la columna vertebral que sostiene mi vida.

*Gracias a mi **mamá** y a su gran dedicación, entereza, tenacidad y soporte; a mi **papá**, por su ejemplo, protección y valentía; y a mi **hermana**, por ser mi mejor amiga y el modelo más preciso para ver desde una perspectiva diferente la vida. A los tres, **GRACIAS**, por su apoyo, amor, compañía y comprensión. Los amo. Este trabajo no lo hice yo, lo hicieron ustedes.*

También quiero recordar a todas aquellas personas que me acompañaron durante este recorrido, que me hicieron ser una mejor persona, que me apoyaron incondicionalmente y que no me olvidaron.

A todos ustedes, de nuevo, gracias, es por ustedes que sigo en el camino.

***“Las cicatrices nos recuerdan
donde hemos estado, pero no
ha donde llegaremos”***

J.M.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Abel Santamaría del Ángel, por su apoyo y comprensión durante mi estancia en su laboratorio.

Dra. Verónica Pérez de la Cruz, por la atención y ayuda que me brindó.

A los Drs. René de Jesús Cárdenas Vázquez y Rafael Camacho Carranza, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes a este trabajo.

Biólogo Carlos Iván Falcón Rodríguez, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad.

A mis compañeros del laboratorio de aminoácidos Excitadores, por su continuo y cordial aliento.

A mis compañeros y amigos en la Facultad de Ciencias.

Y, finalmente, a mis padres y a mi hermana por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

***No dejaremos de explorar
Y el final de la exploración será
Llegar al punto de partida
Y conocer el sitio por primera vez.***

T.S. ELIOT

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
Excitotoxicidad	10
Modelos Excitotóxicos	12
Ácido Quinolínico (QUIN)	12
<i>Características</i>	13
<i>Metabolismo</i>	14
<i>Toxicidad</i>	17
Alteraciones Metabólicas y Déficit Energético	19
Modelos de Déficit Energético	20
Ácido 3-Nitropropiónico (3-NP)	21
<i>Características</i>	21
<i>Metabolismo</i>	23
<i>Toxicidad</i>	24
Modelos de Facilitación o Sinergismo	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO	31
General	31
Particulares	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
A. Reactivos	32

B. Animales-----	32
C. Grupos experimentales-----	33
D. Medición de conducta motora-----	35
E. Determinación inmunohistoquímica-----	36
F. Determinación cromatográfica de GABA-----	37
G. Análisis estadístico-----	38
RESULTADOS-----	39
A. Alteraciones en la Conducta Motora-----	39
B. Hallazgos Inmunohistoquímicos-----	45
1. <i>Activación glial inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP</i> -----	45
2. <i>Expresión inmunohistoquímica de iNOS inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP</i> -----	48
3. <i>Expresión inmunohistoquímica de IL-6 inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP</i> -----	51
4. <i>Expresión inmunohistoquímica de TNFα inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP</i> -----	54
C. Cambios en los Niveles Estriatales de GABA-----	57
DISCUSIÓN-----	60
CONCLUSIONES-----	69
PERSPECTIVAS-----	70
REFERENCIAS-----	71
ANEXO A-----	86

Sistema Nervioso Central

ANEXO B-----102

Enfermedad de Huntington

RESUMEN

La excitotoxicidad y el déficit energético son dos procesos comúnmente involucrados en la degeneración y el daño neuronal de diversas patologías del Sistema Nervioso (SN). Con el afán de conocer ampliamente los eventos tóxicos generados por estos procesos se han diseñado diferentes modelos experimentales que representan dichos eventos, particularmente los presentes en la Enfermedad de Huntington. En este trabajo nosotros empleamos el ácido quinolínico (QUIN), el cual es un agonista de receptores NMDA, y al ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor selectivo del complejo II (succinato deshidrogenasa: SDH) de la cadena mitocondrial. Dado que ambos eventos coexisten en las diferentes patologías, recientemente se han diseñado modelos en los cuales ambas condiciones están presentes, para lo cual normalmente se emplean conjuntamente toxinas que produzcan excitotoxicidad y déficit energético. El objetivo de este trabajo es caracterizar un modelo de este tipo, con la administración conjunta a dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP, para comparar los efectos tóxicos producidos en este modelo con los causados por estas sustancias por separado a concentraciones tóxicas. Para esto se evaluaron tres marcadores de degeneración neuronal en siete grupos experimentales como sigue, utilizando ratas macho de la cepa Wistar: 1) un grupo control para QUIN (solución salina i.e.), 2) un grupo control para 3-NP (solución salina i.p.), 3) un grupo con dosis tóxicas de QUIN (modelo excitotóxico; 240 nmol/ μ L, i.e.), 4) un grupo con dosis tóxicas de 3-NP (modelo de déficit energético; 30 mg/Kg, i.p.), 5) un grupo con dosis subtóxicas de QUIN (40 nmol/ μ L, i.e.), 6) un grupo con dosis subtóxicas de 3-NP (9 mg/Kg, i.p.), y finalmente 7) un grupo con dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP administrados conjuntamente (40 nmol/ μ L, i.e. y 30 mg/Kg/día, por 7 días, minibomba osmótica). Después de administradas las toxinas se procedió a la evaluación de la conducta motora (distancia total recorrida y movimientos horizontales y verticales) 1, 7 y 30 días posteriores a la administración de tratamientos. Una vez finalizado el último registro conductual, un total de 29 ratas fueron sacrificadas para la obtención del tejido estriatal y se procedió a la

determinación de los niveles de GABA y de la inmunoreactividad celular contra GFAP, TNF α , IL-6 e iNOS (marcadores de inflamación). Los hallazgos de este trabajo muestran que los grupos con dosis subtóxicas solas de QUIN y 3-NP no provocaron ningún efecto en los marcadores evaluados, exceptuando la distancia total recorrida, en donde el QUIN provocó la disminución en la locomoción a partir de los 7 días y el 3-NP a partir de los 30 días posteriores a su administración; estos grupos también aumentaron el nivel de expresión de GFAP. En cuanto a los grupos en los que se reproducen los modelos de excitotoxicidad y déficit energético, se produjeron resultados similares a los que ya se han reportado por otros grupos de investigación. Finalmente, el grupo en el que se administraron de forma conjunta dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP mostró inicialmente patrones hipocinéticos a partir de los 7 días posteriores a la administración de las toxinas, además de un aumento significativo en la expresión de los marcadores pro-inflamatorios y de activación glial, así como un descenso prominente en los niveles de GABA. Nuestros datos no apoyan significativamente eventos sinérgicos de toxicidad; sin embargo, si muestran un proceso de facilitación tóxica. Estos resultados describen procesos de deterioro celular de neuronas GABAérgicas, lo cual es causante de la disminución en los niveles de GABA y alteraciones locomotoras. Este modelo puede ser una herramienta funcional para una evaluación más profunda de los diferentes procesos de la degeneración neuronal presentes en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington.

INTRODUCCIÓN

Excitotoxicidad

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de mamíferos (Engelsen, 1986; Hebb, 1970), donde actúa sobre receptores ionotrópicos (mayoriariamente para *N-metil-D-aspartato (NMDA)* y *ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoazolpropiónico (AMPA)* y *metabotrópicos (mGlu1-mGlu8)* (Dingledine *et al.* 1999; Greenamyre y Porter, 1994). Es por esto que alteraciones en la homeostasis del glutamato pueden tener importantes repercusiones en las neuronas por la generación de cascadas excitotóxicas (Olney, 1990). Este hecho llevó a la postulación de la hipótesis de la “excitotoxicidad” por la acción del glutamato (Olney *et al.* 1971; Novelli, R. *et al.* 1988), la cual comprende tres supuestos: 1) despolarización de la célula neuronal, produciendo una liberación de aminoácidos excitadores (AAEs); 2) un receptor para aminoácidos excitadores común en el botón postsináptico, regulando la excitación y la toxicidad, y 3) propagación de la cadena de eventos, generando disfunción neuronal y muerte (Bondy y Lebel, 1993; Elinos-Calderón *et al.*, 2009).

En términos generales, la excitotoxicidad involucra un drástico incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en respuesta a una sobreexposición de las neuronas a los efectos de aminoácidos excitadores, como el glutamato y sus análogos. En particular, los receptores NMDA juegan un papel relevante en la neurotoxicidad inducida por los aminoácidos excitadores, ya que son canales ampliamente distribuidos permeables a Ca^{2+} . Cuando el complejo receptor-canal es estimulado por agonistas endógenos o exógenos, un flujo repentino y drástico de este ión hacia el interior de la célula neuronal puede disparar vías metabólicas letales, involucrando enzimas proteolíticas (proteasa y endonucleasas), aumentando así la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) (Rami *et al.*, 1997) y dañando la estructura celular (Arundine y Tymianski, 2003). El incremento en el flujo de Ca^{2+} también es acompañado por la potenciación en la liberación del neurotransmisor que usualmente propaga el daño

celular en una retroalimentación positiva, conduciendo a la célula a la muerte apoptótica o necrótica. Conjuntamente, el aumento en el Ca^{2+} intracelular producirá alteraciones mitocondriales que afectaran su actividad, disminuyendo la producción de ATP (Elinos-Calderón et al., 2009). Estos mecanismos están comúnmente implicados en enfermedades neurodegenerativas, tanto crónicas (Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington (EH), etc.) como agudas (trauma) (Siesjo, 1981; Choi, 1988; Saito *et al.* 1993).

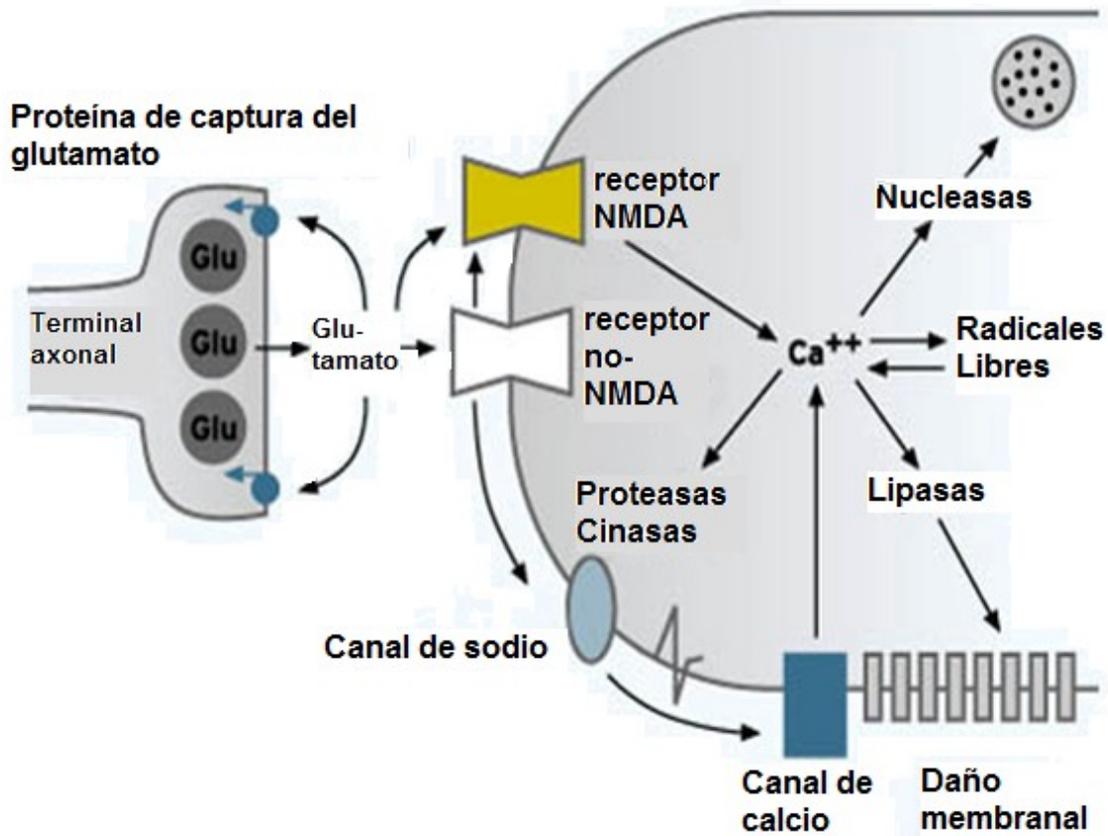


Fig. 1. Mecanismos de toxicidad por glutamato.

Modelos Excitotóxicos

Diferentes compuestos han sido empleados para producir modelos excitotóxicos, entre ellos están el NMDA, el ácido kainico, el ácido iboténico y el ácido quinolínico (QUIN), los cuales activan receptores ionotrópicos y prenden la cascada enzimática típicamente excitotóxica que finalmente llevará a la muerte celular. Los efectos de algunas de estas toxinas han sido investigados en cerebros de ratas con el propósito de comparar la magnitud de los daños neuronales que ellos producen (Foster *et al.*, 1983; Schwarcz *et al.*, 1983; Beal *et al.*, 1986). Después de observar las alteraciones morfológicas y los perfiles bioquímicos en el núcleo estriado de animales lesionados, algunos cambios parecidos a las alteraciones presentes en cerebros con la EH fueron observados; por ejemplo, la disminución de los niveles de GABA, Acetilcolina (ACh) y sustancia P, así como lesiones axonales selectivas. Sin embargo, el QUIN ejerce resultados más selectivos y específicos hacia las neuronas estriatales, por lo que es utilizado ampliamente como modelo de la EH (Novelli, A. *et al* 1988; Elinos-Calderón *et al.*, 2009).

Ácido Quinolínico (QUIN)

Características

El ácido 2,3-piridín-dicarboxílico (QUIN) es un metabolito endógeno del triptófano producido en la vía de la kinurenina (González-Cortés y Santamaría, 2007).

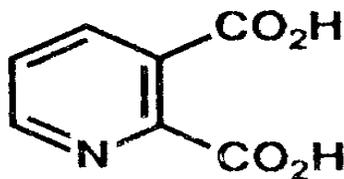


Fig. 2 Estructura del Ácido Quinolínico(QUIN) (Stone, T.W. and Perkins, M.N. 1981)

Hasta 1981 se pensaba que el QUIN era un metabolito fisiológicamente inactivo del triptófano, un mero intermediario a lo largo de la vía de la kinurenina en la síntesis del ácido nicotínico y el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD). La importancia potencial, fisiológica y farmacológica del QUIN fue reconocida con el descubrimiento de su habilidad para activar selectivamente la subpoblación de receptores neuronales de glutamato sensibles al NMDA (Stone y Perkins, 1981). En otras palabras, QUIN actúa como agonista de receptores NMDA y ha sido caracterizado como una excitotoxina capaz de producir un daño neuronal selectivo en el SNC. El QUIN provoca una mayor estimulación de los receptores NMDA, lo que incrementa la permeabilidad del Ca^{2+} , disminuye la formación de ATP, produce estrés oxidativo/nitrosativo (ERO/ERN) y conduce a muerte celular (González-Cortés y Santamaría, 2007).

La selectividad en los patrones neurotóxicos ejercidos por este metabolito es capaz de semejar varias características de la EH en roedores y primates no humanos (Beal *et al.*, 1986; Schwarcz *et al.*, 1983). Algunos cambios que semejan las alteraciones cerebrales en la EH son la disminución de los niveles de GABA, ACh y sustancia P, así como lesión axonal selectiva (Pérez-De La Cruz y Santamaría, 2007).

Asimismo, la capacidad del QUIN para modificar los rasgos de algunos antioxidantes endógenos - como los niveles del glutatión reducido (GSH) y la actividad de la superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD)- en el estriado, así como su habilidad para generar al radical $\cdot OH$ durante las primeras etapas de su toxicidad - han servido para demostrar su naturaleza pro-oxidante. En relación a esto, ha sido demostrado que QUIN puede formar complejos con hierro (hierro (II)-QUIN) los cuales son responsables de incrementar la formación de $\cdot OH$ por la reacción de Fenton, lo que provoca daño al ADN y peroxidación lipídica. Adicionalmente, ratones transgénicos con una expresión limitada de Cu,Zn-SOD han mostrado ser más vulnerables a las acciones tóxicas de QUIN, mientras que los animales que

tienen una mayor expresión de dicha enzima son más resistentes a las acciones nocivas de la toxina (González-Cortés y Santamaría, 2007).

Metabolismo

Como ya ha sido mencionado, el QUIN es un metabolito de la degradación del triptófano a través de la vía de la kinurenina (VK) (González-Cortés y Santamaría, 2007), la cual es la principal ruta catabólica del L-triptófano en mamíferos. La VK es responsable de la biosíntesis de NAD (Stone y Perkins, 1981), y ha sido reportado que está presente en primates no humanos, roedores y otros mamíferos, tanto en hígado como en cerebro (Vender, 1975; Wolfensberg *et al.*, 1983).

En el hígado, el anillo indólico del L-triptófano es abierto oxidativamente por la enzima triptófano dioxigenasa (TDO) para producir la N-formil kinurenina. En el cerebro y otros tejidos periféricos (en respuesta a señales específicas del sistema inmune, (López-González *et al.* 2007)), la enzima responsable de esta reacción es la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), la cual es dependiente del superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Pérez-De La Cruz *et al.*, 2007).

El siguiente paso en la VK es la degradación de la N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN) por la formamidasa. La L-KYN sirve como sustrato para diferentes enzimas como la kinurenasa (formando ácido antranílico), kinurenina 3-hidroxilasa (formando 3-hidroxikinurenina) y las kinurenina aminotransferasas (KATs), las cuales son responsables de la transaminación irreversible de la L-KYN a ácido kinurenico (KYNA). La formación de KYNA en el humano es un proceso muy complejo e involucra dos isoformas de KATs, KAT1 y KAT2. Estas enzimas difieren en su pH óptimo, donde KAT2 actúa en un rango fisiológico y es la principal responsable de la síntesis de KYNA en el cerebro humano (Gramsbergen *et al.*, 1997).

Después de esto, la VK conduce a la formación del ácido quinolínico (QUIN) mediante una serie de pasos los cuales incluyen la hidroxilación de L-KYN a 3-

hidroxikinurenina (3-HK). Esta reacción es catalizada por la kinurenina hidroxilasa, una enzima localizada en la membrana mitocondrial externa (Okamoto *et al.*, 1967), y requiere una molécula de NADPH como donante de un electrón. Posteriormente la kinureninasa, una enzima piridoxal dependiente de fosfato localizada en el dominio citosólico, convierte la 3-HK a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA). Ambas enzimas, la kinureninasa y la kinurenina hidroxilasa, están presentes en el SNC, pero con muy baja actividad.

La 3-hidroxiantranilato dioxigenasa (3-HAO) abre el anillo de la 3-HA para producir el semialdehído 2-amino-3-carboximucónato, un intermediario inestable el cual es inmediatamente transformado a QUIN. En el cerebro, la 3-HAO muestra una mayor actividad que otras enzimas de la VK (Okuno *et al.*, 1987; Saito *et al.*, 1992). Evidencia inmunohistoquímica ha demostrado que la 3-HAO y las KATs están localizadas en los astrocitos que se encuentran rodeando las sinapsis glutamatérgicas en el SNC (Roberts *et al.*, 1992; 1995). Por último, el QUIN es metabolizado a NAD \pm por la QUIN fosforibosil transferasa (QPRT), una enzima localizada también en astrocitos (Stone, 1993).

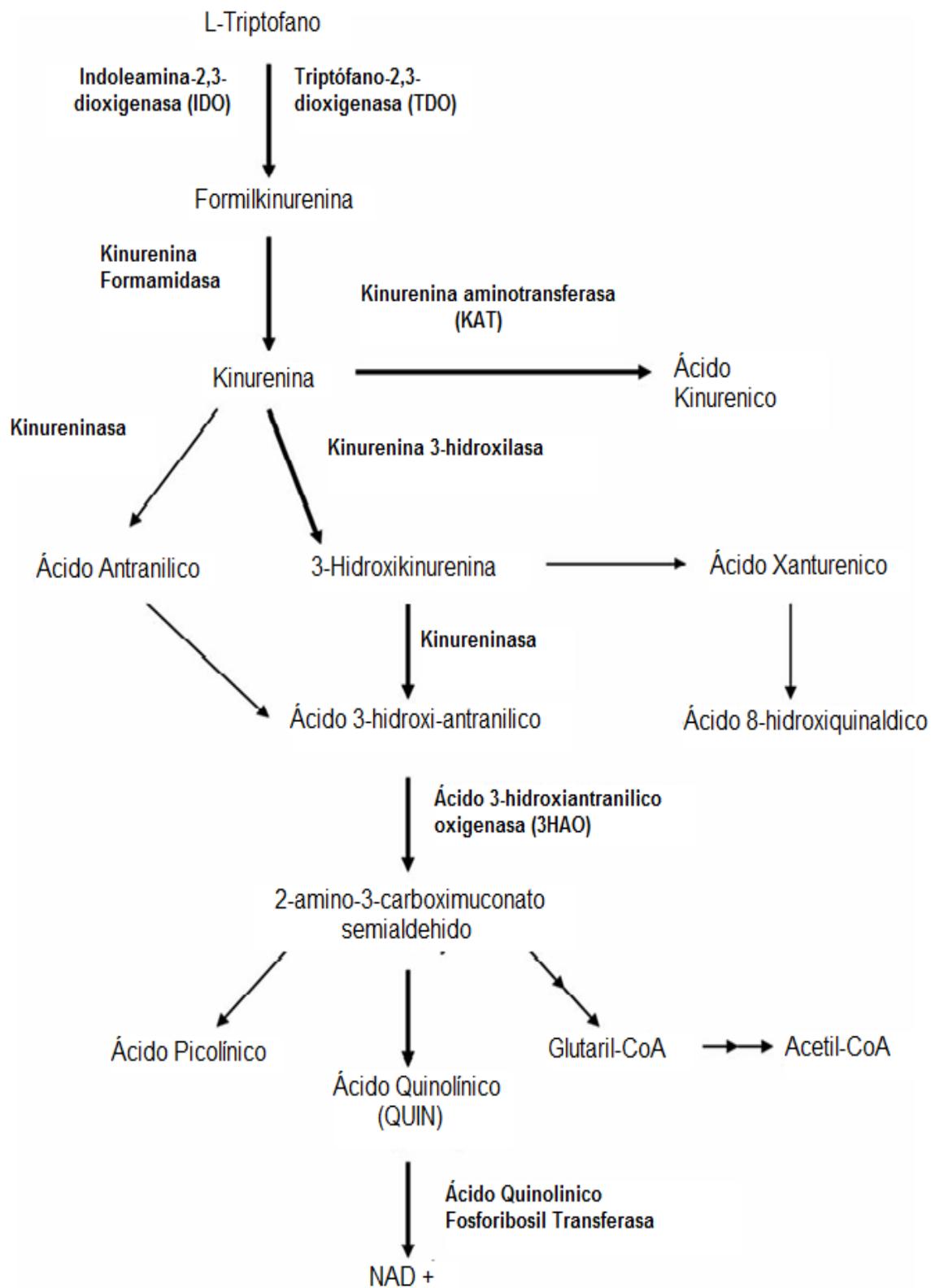


Fig. 3 Vía de la kinurenina del metabolismo del triptofano (Modificado de Pérez-De La Cruz *et al.*, 2007)

Toxicidad

Se piensa que los receptores a glutamato en el cerebro desempeñan un papel dominante en el daño neuronal que ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas. De los varios subtipos de receptores que pueden ser activados por el glutamato, aquellos sensibles al N-metil-D-aspartato (NMDA) han recibido mayor atención debido a que su activación induce el incremento sustancial en el flujo de calcio al interior de las neuronas, lo cual puede disparar una serie de eventos, como la activación de proteasas, conduciendo al daño neuronal (Schwarcz *et al.*, 1983; Stone *et al.*, 1987; Kim y Choi, 1987).

El QUIN ha sido reconocido como un intermediario a lo largo de la vía de la kinurenina, conduciendo a la síntesis de los co-factores esenciales como el ácido nicotínico y NAD, pero un aspecto potencialmente relevante viene con el descubrimiento de que el QUIN puede activar selectivamente la sub-población de receptores de glutamato sensibles a NMDA (Stone y Perkins, 1981). Esto permite que el QUIN no solo excite neuronas (Stone *et al.*, 1989), sino también cause daño neuronal cuando es inyectado directamente dentro de áreas del cerebro (Schwarcz *et al.*, 1983).

Una gran cantidad de evidencia ha sido acumulada desde 1981, sugiriendo que el QUIN puede jugar un papel importante en la patología de la demencia debida al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y en un gran número de enfermedades del SN (Stone, 2001). Por ejemplo, se ha mostrado un incremento en la actividad de la enzima IDO (indoleamina 2,3 dioxigenasa) en cerebros *postmortem* de pacientes con SIDA comparada con cerebros de pacientes control. Además, el aumento en la actividad de esta enzima es acompañado por el incremento en los niveles de QUIN (Pérez-De La Cruz, V. *et al.*, 2007).

Existe debate sobre si el porcentaje de QUIN encontrado en el cerebro o en líquido cefaloraquídeo puede ser suficiente para producir daño neuronal. Los

niveles de QUIN en el cerebro raramente exceden 1 μM . Sin embargo, estos niveles pueden ser suficientes para causar daño neuronal significativo, ya sea por la activación directa de receptores NMDA o por la liberación de glutamato endógeno (Connick y Stone, 1986; 1988).

Concentraciones micromolares de QUIN son tóxicas cuando las células son expuestas a estas concentraciones por varias horas (Kim y Choi, 1987), y concentraciones submicromolares pueden producir neurotoxicidad en cultivos si son mantenidos por varias semanas (Whestsell y Schwarcz, 1989). A concentraciones de 350 nM por 5 semanas, el QUIN causa pérdida de la densidad celular y de proteínas asociadas a microtubulos. Muchas células presentaron hinchazón o edema, con varicosidades dendríticas y daño en el ensamblaje microtubular (Kerr *et al.*, 1995; 1998). Adicionalmente a los efectos tóxicos sobre las neuronas, el QUIN puede inducir una disfunción mitocondrial progresiva, la cual puede ser un factor que contribuye a la neurodegeneración. Dicha disfunción mitocondrial es caracterizada por la disminución en los niveles de ATP y el consecuente desbalance iónico causante de la liberación de neurotransmisores, que a su vez, provocaran alteraciones metabólicas que culminaran en la muerte neuronal (Bordelon *et al.*, 1997).

La neurotoxicidad producida por QUIN también puede depender, al menos en parte, de la producción de especies reactivas del oxígeno, ya que su actividad neurotóxica puede ser prevenida por agentes atrapadores de radicales libres como la α -feníl-t-butílnitrona (Nakao y Brundin, 1997; Nakai *et al.*, 1999). En preparaciones de cerebro de rata se ha encontrado que 100 μM de QUIN aumenta el porcentaje de peroxidación lipídica a más del 256 % (Ríos y Santamaría, 1991).

En resumen, los diversos trabajos catalogan al QUIN como: a) un metabolito endógeno de la vía de la kinurenina, cuyo principal mecanismo de acción es ser un agonista selectivo del receptor para NMDA (Stone, 1993); b) generador de alteraciones metabólicas entre las que destacan la reducción en el consumo de O_2 mitocondrial, disminución en los niveles de ATP y NAD^+ (Bordelon *et al.* 1997); c) metabolito endógeno que al aumentar las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} ,

altera los niveles de glutamato, aspartato y GABA, además, promueve la formación de ERO/ERN llevando así al daño oxidativo y finalmente a una muerte celular necrótica o apoptótica dependiendo de la severidad del insulto tóxico (Foster *et al.*, 1983; During *et al.* 1989; Santamaría y Ríos, 1993); y d) por las características antes mencionadas, la lesión intraestriatal con QUIN representa un buen modelo animal capaz de reproducir la pérdida selectiva de neuronas GABAérgicas y colinérgicas, lo cual está presente en la EH (Bordelon *et al.*, 1997; El-Defrawy *et al.*, 1986).

Alteraciones Metabólicas y Déficit Energético

El SNC es particularmente vulnerable a variaciones en los recursos energéticos debido al elevado metabolismo de las células neuronales y su constante demanda de sustratos. Por lo tanto, cualquier alteración en el metabolismo energético representa un riesgo potencial de pérdida de viabilidad neuronal (Lees, 1993). Cambios en la disponibilidad de sustratos energéticos (como carencia de oxígeno o glucosa) producen grandes desbalances en la concentración iónica, lo cual afecta el potencial de membrana con una despolarización posterior (Martin *et al.*, 1994) ya que las ATPasas de membrana no son capaces de sostener el potencial de reposo. Entonces el Ca^{2+} llega a ser esencial para estos eventos, como un incremento drástico en sus concentraciones citosólicas por la apertura de canales de membrana dependientes de voltaje y complejos canal-receptor NMDA, dependientes de voltaje que disparan eventos excitotóxicos, los cuales ya han sido descritos anteriormente. En los últimos años varias enfermedades asociadas con alteraciones en el metabolismo energético han sido descritas (Pérez-De La Cruz y Santamaría, 2007). Tal es el caso de la EH, en la cual se ha reportado que los niveles de glucosa y oxígeno disminuyen en los ganglios basales y corteza cerebral (Beal, 1992).

La disfunción mitocondrial es la principal fuente de especies reactivas del oxígeno (ERO). La excitotoxicidad mediada por ERO también induce la entrada masiva de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, promoviendo la liberación de este

ión de fuentes intracelulares al citoplasma, dando como resultado la activación de la enzima oxido nítrico sintasa neuronal u oxido nítrico sintasa tipo I (nNOS o NOS-I), con la liberación subsecuente de óxido nítrico (NO). A su vez, NO es transformado en peroxinitrito (ONOO⁻) después de reaccionar con el anión superóxido (O₂⁻) de la cadena transportadora de electrones. Estos eventos crean un desbalance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes, caracterizado por la producción excesiva de ROS, como O₂⁻, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ONOO⁻, y la reducción de sistemas antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peróxidasa (GPx)) y no enzimáticos (glutatión reducido (GSH)), resultando en la aparición de un estatus oxidante exacerbado caracterizado por daño macromolecular. Este desbalance promueve cascadas de estrés oxidante típicas como la oxidación de proteínas, daño al ADN, y peroxidación lipídica. Este fenómeno está asociado con daño celular y muerte neuronal, y juega un rol crucial en procesos neurodegenerativos (Tunéz *et al.*, 2010).

Modelos de Déficit Energético

Con el fin de reproducir a nivel experimental las alteraciones metabólicas observadas en la EH y otras patologías relacionadas, diferentes modelos experimentales han sido diseñados utilizando una gran variedad de toxinas mitocondriales. Entre éstas se pueden mencionar al malonato, al MPP⁺, a la rotenona y al ácido 3-nitropropiónico (3-NP). Estas toxinas producen un aumento en la formación de lactato, reducción de ATP y degeneración neuronal similar a la producida por el QUIN o el NMDA (Brouillet *et al.*, 1996; Shulz *et al.*, 1996); se cree que su mecanismo de acción involucra varias fases iniciadas por un desbalance metabólico crónico (despolarización de la membrana celular, liberación del Mg²⁺ bloqueando al receptor NMDA y el subsecuente aumento en el Ca²⁺ intracelular (Greene y Greenamyre, 1996); es por esto que la administración de moléculas inhibitoras del metabolismo energético son usadas como modelos de daño neuronal (Elinos-Calderón *et al.*, 2009).

Ácido 3-Nitropropiónico (3-NP)

Características

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (Anderson, A.C., *et al.* 2005) es una toxina proveniente de plantas y hongos la cual inhibe irreversiblemente el complejo II de la cadena transportadora de electrones (Ludolph *et al.*, 1991).

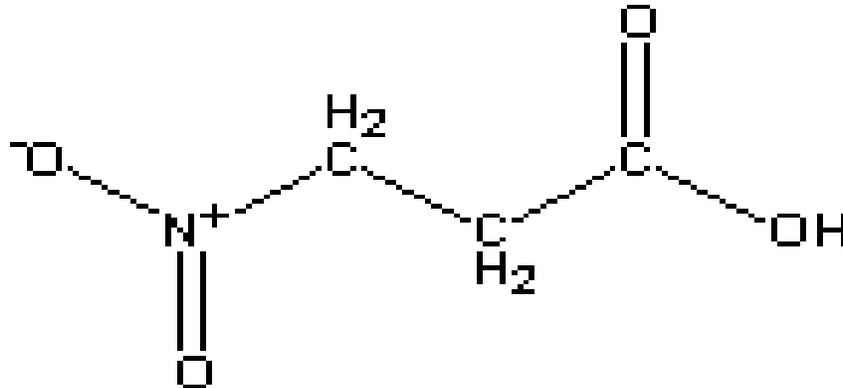


Fig 5. Ácido 3- Nitropropionico (3-NP) (Chu *et al.*, 1978)

El 3-NP fue originalmente caracterizado como el agente tóxico responsable de la encefalopatía aguda en el ganado de las regiones occidentales de América del Norte. Los animales ingirieron accidentalmente *Astragalus (indigofera)*, un hongo que contiene un alto porcentaje del precursor del 3-NP, el 3-nitropropanol. Investigaciones bioquímicas posteriores demostraron que el 3-NP es un inhibidor irreversible del ciclo de los ácidos tricarboxilicos y de la succinato deshidrogenasa (SDH), la principal enzima constituyente del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (Ludolph *et al.*, 1991; Alston *et al.*, 1977; Coles *et al.*, 1979).

Otros casos reportados de envenenamiento por 3-NP ocurrieron en China, debidos al consumo de azúcar de caña contaminada por el hongo *Arthrimum sp.*, produciendo encefalopatía aguda en niños y adultos, seguida por muchos casos de distonia retrasada y discinesia asociada con degeneración del putamen (He *et al.*, 1995).

A principios de 1980, Gould y colaboradores demostraron que los tratamientos con 3-NP producen degeneración preferencial del estriado en ratas y ratones (Gould y Gustine, 1982). Ellos mostraron posteriormente que el 3-NP producía lesiones por “hipoxia histotóxica” sin gran participación de los efectos periféricos del 3-NP, como el incremento en la presión arterial sanguínea (Hamilton y Gould, 1987a).

Numerosos estudios en cultivos primarios de neuronas mostraron que, en ciertas circunstancias, un bloqueo del metabolismo de energía oxidante puede disparar secundariamente la cascada excitotóxica de muerte celular (en ausencia de un incremento en las concentraciones extracelulares de glutamato), y este fenómeno involucra principalmente a receptores NMDA (Novelli *et al.*, 1988; Zeevalk y Nicklas, 1990; 1992; Greene *et al.*, 1998).

Beal fue el primero en sugerir que el tratamiento crónico con 3-NP en ratas puede replicar los defectos mitocondriales constantes y parciales vistos en pacientes con la EH, así como la degeneración estriatal selectiva con características histológicas y neuroquímicas ocurridas en la EH (Brouillet *et al.*, 2005). Apoyando estas hipótesis, se encontró que la liberación crónica y constante de 3-NP por más de 4 semanas usando mini bombas osmóticas en ratas conduce a la degeneración preferencial de neuronas espinosas medianas con la preservación de las terminaciones nerviosas aferentes, interneuronas colinérgicas largas e interneuronas no-espinosas positivas para NADPH-diaforasa (Beal *et al.*, 1993; Brouillet *et al.*, 1993). Estas lesiones fueron asociadas con astrogliosis y anomalías morfológicas de neuronas espinosas medianas relacionadas a la extensión de neuritas, lo cual es un marcador de cambios histológicos en pacientes con la EH (Beal *et al.*, 1993). Aparte de las consideraciones histológicas, el tratamiento con 3-NP a ratas usando bombas osmóticas produjo hiperactividad transitoria, incoordinación general, distonia bilateral, marcha anormal y comportamiento perseverante (Beal *et al.*, 1993; Borlogan *et al.*, 1995; Guyot *et al.*, 1997; El Massioui *et al.*, 2001).

Un patrón similar al encontrado en la EH puede ser desencadenado por el 3-NP, dependiendo de la dosis y el tiempo de administración, y provocar así la degeneración de las neuronas espinosas medianas GABAérgicas (Guyot *et al.*, 1997). Suministrado sistémica y crónicamente, el 3-NP causa degeneración neuronal bilateral, simétrica y selectiva del estriado lateral (restringida a la zona dorsolateral del caudado-putamen), similar a lo acontecido en pacientes con la EH, mientras que una administración aguda desencadena lesiones más difusas. La muerte celular promovida por el 3-NP es tanto necrótica como apoptótica, situación similar a la ocurrida en la EH (Pang y Geddes, 1997). Aunque la intoxicación por 3-NP afecta principalmente al núcleo estriado, también puede afectar a otras áreas localizadas en la corteza cerebral, tálamo e hipotálamo (Ouay *et al.*, 2000). Estas lesiones se presentan con pérdida neuronal acompañada de una moderada gliosis y descenso en la actividad de la citocromo oxidasa (Túnez y Santamaría, 2009). Adicionalmente, el 3-NP cambia los niveles de otras moléculas, como los endocannabinoides (anandamida y 2-araquidonilglicerol), la sustancia P, la encefalina, la colina acetiltransferasa, la somatostatina, el neuropéptido Y y la neurotensina (Ouay *et al.*, 2000).

Metabolismo

El 3-NP y su precursor el 3-Nitropropanol, así como sus esteres de glucosa y glicósidos, respectivamente, son productos naturales raros producidos en solo unas pocas especies de plantas y hongos. La forma isoelectrónica del 3-NP puede ser convertida, en un pH fisiológico, al dianión más reactivo, el cual inhibe irreversiblemente la succinato deshidrogenasa (SDH).

Los metabolitos producidos por plantas que contienen nitrógeno oxidado – clasificados como glicósidos cianogénicos, glucosinolatos y nitrocompuestos - son derivados de aminoácidos precursores por una vía biosintética común. El paso inicial común para la biosíntesis de esta clase de metabolitos es la N-hidroxilación del aminoácido inicial, seguido por una descarboxilación del hidroxiaminoácido para formar la correspondiente aldoxima.

Las vías biosintéticas luego siguen rutas diferentes para la síntesis de tres clases de productos naturales. Presumiblemente, el ácido aspártico es el precursor de la propionaldoxima, la cual es convertida en el precursor inmediato del 3-NP.

La intoxicación clínica aguda fue observada en varias especies tratadas con 3-NP, ésteres de 3-NP, 3-nitropropanol y miserotoxinas. Estas especies incluyen a pollos, cerdos, conejos, ratones, ratones de pradera, ovejas y ganado. El envenenamiento con estos compuestos probablemente se da por el mecanismo común de toxicidad del 3-NP, donde el 3-nitropropanol es metabolizado a 3-NP después de la absorción en el tracto digestivo. En organismos no rumiantes, los ésteres del 3-NP pueden ser rápidamente hidrolizados por las esterasas del tejido de mamíferos para liberar 3-NP, mientras el 3-nitropropanol es oxidado por la enzima alcohol deshidrogenasa hepática a 3-NP (Borlogan *et al.*, 1999).

El 3-NP, análogo isoelectrónico del succinato, es un inhibidor suicida de la SDH. Alston y colaboradores propusieron que la vía de reacción normal incluye una aproximación temporal con el nitrógeno N-5 de la flavina, la cual, en el caso del 3-NP, colapsa a una aproximación estable, resultando en la inactivación permanente (Alston *et al.*, 1977). Se ha propuesto que el 3-NP es oxidado a 3-nitroacrilato, una molécula inestable que reacciona con algunos residuos en el sitio activo - una cisteína posiblemente - (Huang *et al.*, 2006).

Toxicidad

El 3-NP inhibe irreversiblemente la oxidación del succinato a fumarato realizada por la SDH, enzima constituyente del complejo II de la cadena de transporte de electrones y del ciclo de Krebs (Coyle y Schwarcz, 1976; Alston *et al.*, 1977; Beal *et al.*, 1986). Su inhibición desencadena una reducción intensa en la síntesis de ATP que conlleva a muerte neuronal, en especial en el núcleo estriado. Así, junto con la afectación de los complejos mitocondriales, acontecen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la redistribución del citocromo c (Gu *et al.*, 1996; Tabrizzi *et al.*, 1999).

Se cree que la inactivación de SDH es el resultado de la oxidación del 3-NP a 3-nitroacrilato, el cual se une a la enzima (Coles *et al.*, 1979). Alternativamente, se ha propuesto que el ión nitronato del 3-NP se une irreversiblemente a la flavina, coenzima de la SDH (Alston *et al.*, 1977). En estudios con cultivos primarios se ha evidenciado que el 3-NP induce la presencia de factores como el citocromo c y la proteína Smac/Diablo, asociados a muerte neuronal por apoptosis (Galas *et al.*, 2004).

La inhibición de la SDH por parte del 3-NP desencadena estrés oxidativo (EO) y nitrosativo (EN), caracterizados por la excesiva producción de ERO/ERN y el agotamiento de los sistemas antioxidantes. El aumento citosólico del ión calcio inducido por el 3-NP, y la consiguiente activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) con la producción de NO, desempeñan un papel de extraordinaria magnitud en todo el proceso desencadenado. La entrada de calcio extracelular obedece a la apertura de los canales de membrana dependientes de voltaje y asociados a receptores NMDA, cuyo umbral y sensibilidad a su ligando disminuyen en presencia del 3-NP y promueve situaciones de excitotoxicidad glutamatérgica (Novelli *et al.*, 1988; Beal, 1994).

Los niveles de glutamato son regulados por transportadores dependientes de Na^+ presentes en la glía y las neuronas. La actividad de estos transportadores depende del gradiente de sodio transmembranal generado por la Na^+/K^+ ATPasa, cuyo funcionamiento se ve alterado por la disminución de ATP provocado por el 3-NP. Algunos inhibidores de la fosforilación oxidativa o de la ATPasa Na^+/K^+ inducen al glutamato a convertirse en neurotóxico a concentraciones que normalmente no producirían efectos tóxicos (Novelli *et al.*, 1988). Estudios posteriores únicamente revelaron incrementos moderados en las concentraciones extracelulares del glutamato en el cerebro de ratas tratadas con 3-NP, en contraste con el aumento en los niveles de lactato como evidencia de un metabolismo energético alterado (Beal, 1994; Wullner *et al.*, 1994). Estos resultados son consistentes con el concepto de que el 3-NP causa excitotoxicidad por hacer a las neuronas vulnerables a los niveles basales endógenos de glutamato. Adicionalmente, se

sabe que el 3-NP también cambia la homeostasis del Ca^{2+} bajo condiciones *in vitro*, lo que implica excitotoxicidad. A su vez, la muerte celular neuronal por excitotoxicidad ha sido relacionada con la formación de ERO y ERN (Lafon-Cazal *et al.*, 1993; Alexi *et al.*, 1998), apoyando el papel clave del estrés oxidante en el patrón de toxicidad provocado por 3-NP (La Fontaine *et al.*, 2000). La administración sistémica de 3-NP disminuye los niveles de glutatión, a la vez que potencia la formación de radicales libres y proteínas oxidadas en el estriado (Schulz *et al.*, 1996; Binienda *et al.*, 1998). Además, el uso de antioxidantes endógenos y exógenos bien conocidos, como la coenzima Q_{10} , la N-acetilcisteína, la melatonina, la S-alilcisteína y la dehidroepiandrosterona, resulta en efectos protectores contra el daño neuronal inducido por la toxina (La Fontaine *et al.*, 2000; Túnez *et al.*, 2004; 2005; Nam *et al.*, 2005; Herrera-Mundo *et al.*, 2006; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2006).

Por su parte, la microglia activada por la intoxicación con el 3-NP interviene de manera importante en los procesos de daño celular. Así, el tratamiento agudo con 3-NP causa la invasión por la microglia del área estriatal degenerada, que a su vez induce la producción y liberación de ERO, mecanismo por el que en parte la microglia podría estar involucrada en los fenómenos de neurodegeneración provocados por el 3-NP (Ryu. *et al.*, 2003; Nishino *et al.*, 2000).

Adicionalmente, el 3-NP induce la liberación de moléculas reactivas derivadas del NO mediante la estimulación de la actividad de NOS. Así, la subsiguiente inducción de la NOS trae consigo la producción de NO, que puede reaccionar con el O_2^- , produciendo peroxinitrito (ONOO^-). Esta molécula se caracteriza por ser citotóxica y responsable tanto de la nitración de proteínas como de la posterior producción de radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el más tóxico y nocivo de los radicales libres. Adicionalmente, la administración de 3-NP puede inducir elevación en los niveles de dopamina, de tal forma que este fenómeno es un factor adicional que contribuye a potenciar el efecto tóxico sobre las neuronas GABAérgicas, así que la dopamina endógena contribuye al daño por excitotoxicidad mediante la inhibición

de la recaptura de glutamato y/o la producción de ERO (Túnez y Santamaría, 2009).

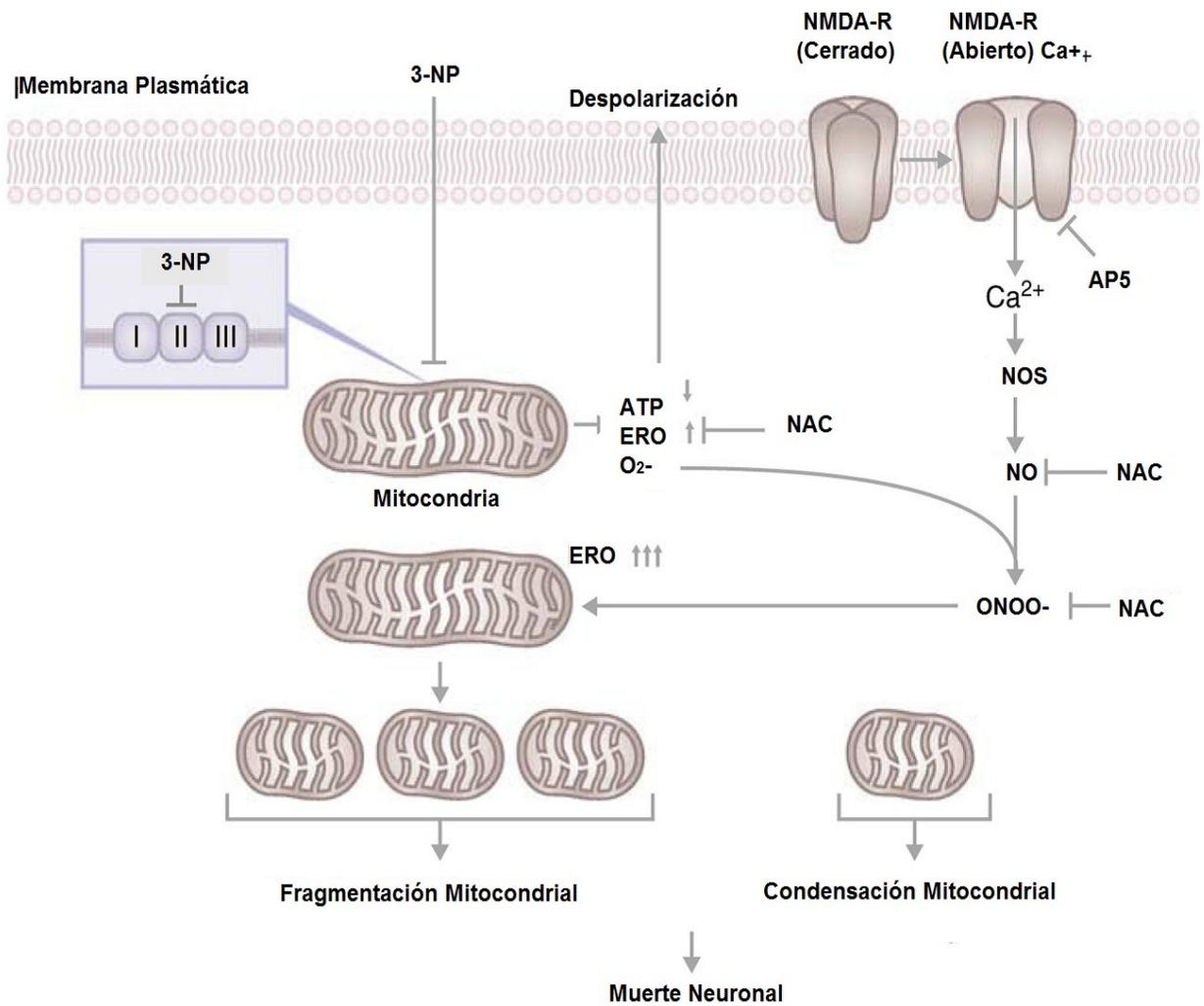


Fig. 4 Inhibición del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial inducida por 3-NP, (Modificado de Liot, G. *et al*, 2009)

Modelos de Facilitación o Sinergismo

En últimas fechas, nuevas perspectivas en el estudio de los mecanismos tóxicos de agonistas del receptor NMDA y toxinas mitocondriales están bajo investigación, así como su co-administración a dosis subtóxicas, lo cual puede mimetizar mejor los eventos fisiopatológicos que se presentan en las enfermedades neurodegenerativas (Jacquard *et al.*, 2006). Esta idea surgió del hecho de que ni la excitotoxicidad ni el desbalance en el metabolismo energético actúan separadamente en la EH y otras enfermedades neurodegenerativas (Silva-Adaya *et al.*, 2008).

Diversos trabajos se han realizado hasta la fecha, los cuales han arrojado información importante acerca de las interacciones que se presentan entre los mecanismos tóxicos evocados por QUIN y por 3-NP. Jacquard y colaboradores, en el 2006, mostraron tanto *in vivo* como en cultivos de neuronas estriatales, que la disfunción mitocondrial producida por 3-NP potencia la toxicidad del QUIN. Dicha potenciación fue asociada al incremento en la actividad de calpainas y a la segmentación, mediada por calpainas, de varias proteínas postsinápticas, sugiriendo un desbalance del Ca^{2+} neuronal en el estriado. Sin embargo, esta desregulación no se debió a la hipersensibilidad de los receptores NMDA (y con esto a la entrada masiva de Ca^{2+} a las neuronas estriatales), sino a una desregulación intracelular de Ca^{2+} (Jacquard *et al.*, 2006). Otros hallazgos fueron, por un lado, la prevención que la levocarnitina (L-CAR) – antioxidante y precursor energético – ejerce sobre la acción sinérgica del QUIN y el 3-NP para incrementar la asimetría motora y disminuir los niveles estriatales de GABA en ratas y en fracciones sinaptosomales (Silva-Adaya *et al.*, 2008), y por otro, el incremento de la peroxidación de lípidos y disfunción mitocondrial en fracciones sinaptosomales expuestas a ambas toxinas bajo condiciones fisiológicas de disponibilidad de calcio extracelular, así como su atenuación por diversos agentes (dizocilpina, porfirinato de hierro, L-acetil carnitina y S-alilcisteína); aunado a esto, se demostró que el mecanismo tóxico evocado por dicho modelo sinérgico dependía en mayor

proporción a las alteraciones en el calcio intracelular (Pérez-De La Cruz *et al.*, 2008; Elinos-Calderón, D. *et al* 2009).

Otras publicaciones que explotan la idea de un posible sinergismo o potenciación de la toxicidad mediada por el receptor NMDA por deficiencias metabólicas, en las cuales no se utilizaron QUIN y 3-NP específicamente, son primeramente, el trabajo de Greene y Greenamyre en 1995 en el cual se plantea que dosis subtóxicas de malonato - inhibidor de SDH - potencia la neurotoxicidad de tres diferentes agonistas de aminoácidos excitadores como el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido S- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (S-AMPA) y el glutamato. Sus resultados indican que la inhibición metabólica exacerba la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA y receptores no-NMDA, y sugieren que el receptor NMDA puede jugar un papel importante en situaciones de compromiso metabólico *in vivo*, donde el glutamato es el agonista endógeno. En esta misma línea, Bazzett y colaboradores en 1996 se enfocaron a probar el posible efecto sinérgico de la administración de dosis subtóxicas de QUIN más malonato. Este esquema de administración produjo lesiones más grandes que las producidas por las toxinas por separado, lo cual demuestra el efecto sinérgico que el malonato ejerce sobre la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA.

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas no presentan un elemento patológico único, y los diferentes componentes tóxicos presentes en estas enfermedades generalmente se acompañan entre sí; es por esta razón que este trabajo va encaminado a caracterizar un modelo de facilitación tóxica en el que se utilicen de manera conjunta dos toxinas – QUIN y 3-NP – que evoquen el daño excitotóxico y el déficit energético presentes en los eventos neurodegenerativos para, de esta forma, poder tener una mejor y más completa herramienta que permita evidenciar y esclarecer los mecanismos de daño celular.

HIPÓTESIS

Dado que la administración de dosis tóxicas de QUIN y 3-NP de manera independiente en ratas genera patrones de toxicidad diferenciales, entonces al administrar dosis subtóxicas de ambas toxinas de manera conjunta habrá un evento sinérgico que propiciará una potenciación en los diferentes marcadores de toxicidad, tanto bioquímicos como conductuales, así como en los eventos de muerte celular, lo que se reflejará a su vez en disminución en los niveles de GABA y aumento en marcadores inflamatorios.

OBJETIVOS

General

Caracterizar el posible sinergismo en la administración conjunta de QUIN y 3-NP en dosis subtóxicas sobre diferentes marcadores de toxicidad estriatal (alteraciones motoras, disminución de GABA, generación de citocinas, etc.) y determinar si siguen el mismo patrón de daño que los mismos modelos por separado a concentraciones tóxicas.

Particulares

- Evaluar la conducta motora como reflejo de alteraciones cinéticas en un modelo conjunto de excitotoxicidad y déficit energético, así como en los modelos tóxicos.
- Caracterizar el efecto de la co-administración de QUIN + 3-NP, 3-NP Y QUIN a través de las células reactivas a IL-6, GFAP, TNF α e iNOS.
- Medir los niveles estriatales de GABA como un marcador neuroquímico típico de modelos fenotípicos de daño neuronal en los tres modelos experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP), el ácido quinolínico (QUIN), el ácido mercaptopropiónico y el ácido γ -aminobutírico (GABA) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos los demás reactivos fueron adquiridos de otras fuentes comerciales conocidas. El agua desionizada utilizada para la preparación de las soluciones se obtuvo del sistema Milli-RQ (Millipore, Bedford, MA, USA).

Animales

Ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 250 y 300 g fueron utilizadas para este estudio. Para todos los fines experimentales, los animales fueron alojados en cajas de acrílico (6 por caja) y provistos con rat chow, una dieta comercial estándar, (Laboratory rodent diet 5001; PMI Feeds Inc., Richmond, IN, USA) y agua *ad libitum*. El cuarto de alojamiento fue mantenido bajo condiciones constantes de temperatura ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50\pm 10\%$), e iluminación (ciclos luz/oscuridad de 12 h). Un total de 48 ratas fueron utilizadas; 43 ratas se usaron para la medición de la conducta motora y, posterior a esto, 19 cerebros se emplearon para los ensayos inmunohistoquímicos y los otros 29 cerebros para la determinación cromatográfica de GABA (y otras pruebas experimentales como la peroxidación lipídica y la funcionalidad mitocondrial -, las cuales no forman parte de este trabajo. Todos los procedimientos con animales fueron llevados a cabo de acuerdo a las normas de los *Institutos Nacionales en la Guía Sanitaria para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*, y a las normas locales en el uso ético de los animales de la Secretaría de Salud, México. Durante los experimentos se hizo el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

Grupos experimentales

Para los propósitos de este trabajo se utilizaron un total de siete grupos experimentales.

Control 3-NP (n=8) (inyección intraperitoneal (i.p.) de solución salina)

Control QUIN (n=8) (inyección intraestriatal (i.e.) de solución salina; ambos estriados)

3-NP tóxico (n=8) ((30 mg/Kg, i.p.), dosis única)

QUIN tóxico (n=8) (lesión i.e, 120 nmoles por estriado, coordenadas estereotaxicas: +0.5 mm anterior a bregma, -2.6 y +2.6 mm lateral a bregma y -4.5 mm ventral a dura (Paxinos y Watson, 1998).

Control 3-NP subtóxico (n=4) (9 mg/Kg/día x 7 días)

Control QUIN subtóxico (n=4) (20 nmol/μL por cada estriado)

QUIN + 3-NP (n=8) (20 nmoles/μL por cada estriado + 9 mg/Kg/día durante 7 días, respectivamente)

Para el caso del modelo conjunto cabe resaltar, que a los animales (n=8) se les implantó subcutáneamente una minibomba osmótica en la base dorsal de la cabeza liberando 3-NP (9 mg/Kg/día durante 7 días). Siete días después de la implantación de la minibomba osmótica se procedió a la administración de una dosis subtóxica de QUIN en cada estriado (20 nmol/μL i.e. por estriado), después de haber retirado la bomba.

TIEMPO	T(-7d)	T(0)	T(1d)	T(7d)	T(30d)
CN		Inyección i.p. solución salina	ECM	ECM	<ul style="list-style-type: none"> • ECM • PT • IAM
CQ		Inyección i.e. solución salina	ECM	ECM	<ul style="list-style-type: none"> • ECM • PT • IAM
3-NP		Inyección i.p. 30 mg/Kg de 3-NP	ECM	ECM	<ul style="list-style-type: none"> • ECM • PT • IAM
QUIN		Inyección i.e. 240 nmol/ μ L de QUIN	ECM	ECM	<ul style="list-style-type: none"> • ECM • PT • IAM
QUINst+3-NPst	Implantación minibomba osmótica liberando 3-NP	Inyección i.e. 40 nmol/ μ L de QUIN	ECM	ECM	<ul style="list-style-type: none"> • ECM • PT • IAM
3-NPst		Inyección i.p. 9 mg/Kg de 3-NP	ECM	ECM	<ul style="list-style-type: none"> • ECM • PT • IAM
QUINst		Inyección i.e. 40 nmol/ μ L de QUIN	ECM	ECM	<ul style="list-style-type: none"> • ECM • PT • IAM

ECM= Evaluación conducta motora
PT= Perfusión transcardial p/inmunohistoquímica
IAM= Inyección ácido mercaptopropiónico para bloqueo de GABA

Tabla 1. Tabla metodológica comparativa

Todos los animales fueron mantenidos vivos durante un mes después de la lesión (i.e. de QUIN o i.p. de 3-NP) para evaluar la conducta motora a las 24 horas y a los 7 y 30 días. Después, se prosiguió con la determinación inmunohistoquímica y el análisis cromatográfico de GABA.

Medición de conducta motora

La evaluación de la actividad motora se concentró en la medición de los movimientos horizontales, verticales y la distancia total recorrida, con la ayuda de un Versamax Animal Activity Monitor and Analyzer (AccuScan Instruments Inc., Columbus, OH, USA).

El dispositivo es capaz de detectar movimientos en diferentes direcciones ya que los animales bajo evaluación cruzan las líneas virtuales proyectadas por detectores de movimiento; enseguida, estos movimientos son registrados numéricamente en la computadora. Adicionalmente, este aparato es capaz de seguir la trayectoria precisa y la distancia caminada por los animales debido a estos sensores. De esta manera, los datos colectados de este dispositivo incluyen la distancia total caminada/recorrida, así como los movimientos horizontales y verticales totales. Por consiguiente, ambos resultados fueron expresados como la distancia total caminada o recorrida (cm) en 60 minutos, o como la cuenta total por 60 minutos, respectivamente. Cada una de las ratas de cada grupo se colocó por separado dentro del monitor por una hora, en la cual se capturaban los datos en una computadora convencional. Se proporcionó a los animales un período de adaptación de 10 minutos. Estas mediciones se realizaron 24 horas, 7 días y 30 días después de la administración con cada toxina (solución salina, QUIN, i.e., 3-NP, i.p. o su combinación). Los resultados obtenidos se acomodaron por grupos experimentales para el análisis estadístico.

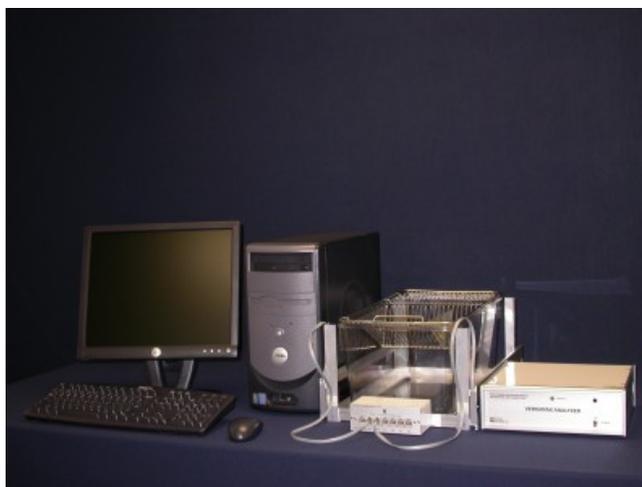


Fig. 6 Monitor y Analizador de conducta animal Versamax.

Determinación inmunohistoquímica

La detección inmunohistoquímica de la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), la Interleucina 6 (IL-6), el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) y la Sintasa de Oxido Nítrico inducible (iNOS) fue empleada como marcador morfológico de gliosis reactiva e inflamación, respectivamente.

Treinta días después de la inyección de las toxinas, los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos transcárdialmente con buffer de fosfatos (PBS) 0.1 M, seguido por paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron removidos y almacenados en PBS por una semana. Posterior a esto, los cerebros se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5-7 μ m de grosor, obtenidas cada 100 μ m, cubriendo una distancia total de 300 μ m (para el caso de los cerebros lesionados con QUIN, las secciones estriatales fueron obtenidas 100 μ m antes y 100 μ m después del tracto de la aguja). Todas las secciones fueron puestas en portaobjetos, etiquetadas e inmunohistoquímicamente desparafinadas con una serie de inmersiones en xileno y alcohol, de diferentes gradaciones, y enjuagadas tres veces en PBS. Después del lavado, las secciones fueron incubadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1% por 10 minutos para reducir la actividad de la peroxidasa endógena. Una vez más, las secciones fueron lavadas en PBS (dos veces por 5 minutos) e incubadas

en citrato de sodio 10 $\mu\text{mol/L}$ (pH 6.0) en un baño de agua por 30 minutos, enjuagadas tres veces en PBS e incubadas en albumina de suero bovino al 1% para bloquear la inmunoreactividad no específica. Después de dos lavados consecutivos con buffer Tris, las secciones fueron separadas según el marcador a detectar, e incubadas toda la noche a 4°C con buffer Tris conteniendo, según sea el caso, el anticuerpo monoclonal primario que reconoce a GFAP, IL-6, TNF α , o iNOS (dilución 1:100, DAKO; Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA). Se empleó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (DAKO Kit; Dakocytomation), y visualizado con diaminobenzidina. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina y montadas con cubreobjetos. Cada una de las secciones fueron examinadas individualmente mediante microscopía de campo claro en un microscopio Leica DMLS Galen III (Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Germany) con cámara de video digital a color SSC-DC14 acoplada (Sony Electronics, Teaneck, NJ, USA).

Determinación cromatográfica de GABA

Los niveles estriatales de GABA fueron evaluados en muestras de tejido de los animales expuestos al tratamiento en cada uno de los grupos experimentales (la mitad de individuos por cada grupo), como un índice común de déficit neuroquímico en esta región cerebral. Los niveles de GABA fueron medidos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) con detección fluorométrica, como ha sido descrito anteriormente (Santamaría *et al.*, 1996; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2005). Treinta días después de la administración de las toxinas, las ratas de los diferentes grupos experimentales fueron inyectadas con ácido mercaptopropiónico (1.2 mmol/Kg, i.v.) y decapitadas dos minutos después. Las muestras de tejido estriatal fueron diseccionadas, homogenizadas en 15 volúmenes de solución metanol-agua (85 %, v/v), y centrifugadas a 15,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue almacenado a -70°C hasta que el análisis cromatográfico fuera hecho. De cada muestra se tomaron 100 μL del sobrenadante y se aforó a 5 mL con agua. Posteriormente, se tomaron 50 μL de la solución anterior, se le agregaron 50 μL de

oftaldialdehído (OPA) y se agitó por un minuto. La solución fue inyectada en la columna de fase móvil de la estación cromatográfica BAS CC-5/PM-80 (West Lafayette, IN, USA) con un detector fluorométrico BAS FL-45^a acoplado.

Análisis estadístico

Todos los datos están presentados como promedio \pm error estándar. Los resultados de la evaluación de la conducta motora (24h, 7 y 30 días), el conteo de células inmunoreactivas a los diferentes marcadores (GFAP, iNOS, IL-6 y TNF α) y los niveles estriatales de GABA fueron analizados mediante la ANOVA de una vía seguida por una prueba múltiple de comparación de Newman-Keuls. Para el análisis de los datos conductuales en conjunto se utilizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni. Para todos estos propósitos se utilizó el software Prism 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Alteraciones en la Conducta Motora

Para el grupo administrado con dosis subtóxicas de 3-NP, los patrones de motricidad fueron muy similares al grupo control, presentando un ligero aumento en los movimientos a la semana de administrada la toxina, sin que este aumento fuera significativo; sin embargo, al mes se encontró un patrón hipocinético ($p < 0.05$). Por su parte, el grupo administrado con dosis subtóxicas de QUIN presentó una disminución sostenida de la actividad motora, la cual solo fue significativa a la semana y al mes después de administrada la toxina ($p < 0.05$). El grupo administrado con QUINst y 3-NPst de forma conjunta (QUINst + 3-NPst) presentó un patrón hipocinético durante todo el mes, teniendo una mayor significancia a los siete días de administradas las toxinas ($p < 0.01$). Haciendo una gráfica de correlación de tiempo para este modelo podemos observar que el modelo de coadministración muestra ser hipocinético comparado con el control y parece seguir un patrón similar al del QUINst, pero más agresivo. Todo lo anterior se muestra en la figura 7.

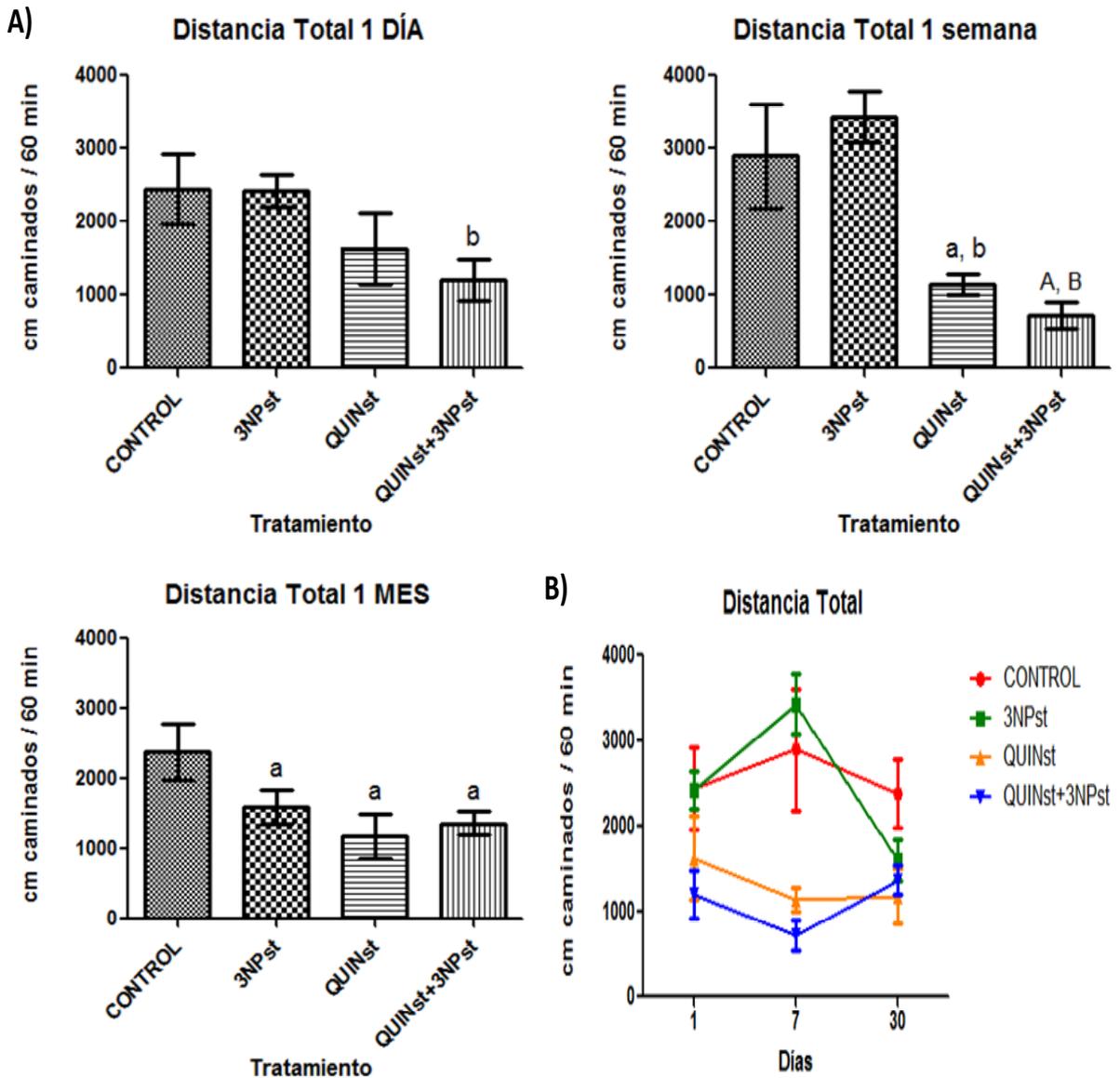


Fig 7. Efecto de la administración subtóxica y conjunta de QUIN y 3-NP sobre la actividad motora (distancia total recorrida) en ratas. La evaluación de la distancia total recorrida fue registrada 1, 7 y 30 días después de la última administración de la toxina correspondiente – solución salina i.p e i.e.; QUINst + 3-NPst (40 nmol/ μ L, i.e y 9 mg/Kg 1 μ L/hora en 7 días, minibomba respectivamente); 3-NP (9 mg/Kg, i.p.); QUIN (40 nmol/ μ L, i.e.) –. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de seis ratas por grupo. A) ^adiferente a control; ^bdiferente a 3-NPst; $p < 0.05$. ^Adiferente a control, ^Bdiferente a 3-NPst; $p < 0.01$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. B) ANOVA de dos vías, donde hubo una diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.0001$).

En las Figuras 8 y 9 se muestran los patrones de movimientos horizontales y verticales, respectivamente, de los animales administrados con QUIN + 3-NP, así como sus respectivos controles. Con respecto a los movimientos horizontales, no se observaron cambios en los controles de las toxinas subtóxicas con respecto al control, a excepción de QUINst, que mostró un patrón hipocinético significativo al mes de administrada la toxina ($p < 0.05$). Por su parte, el grupo de QUINst + 3-NPst tampoco presentó cambios significativos, excepto al mes de administradas las toxinas, cuando se distinguió un patrón hipocinético significativo respecto del control ($p < 0.05$).

En los movimientos verticales se puede distinguir que no hubo cambios significativos con respecto al grupo control en los tres grupos evaluados (QUINst, 3-NPst y QUINst + 3-NPst), aunque se observó un patrón hipocinético no significativo durante todo el mes (excepto a las 24 horas en el caso del grupo 3-NPst). La comparación de la totalidad de datos reveló que hay una diferencia significativa relacionada, tanto a los diferentes tratamientos experimentales, como al tiempo de evaluación de la conducta motora.

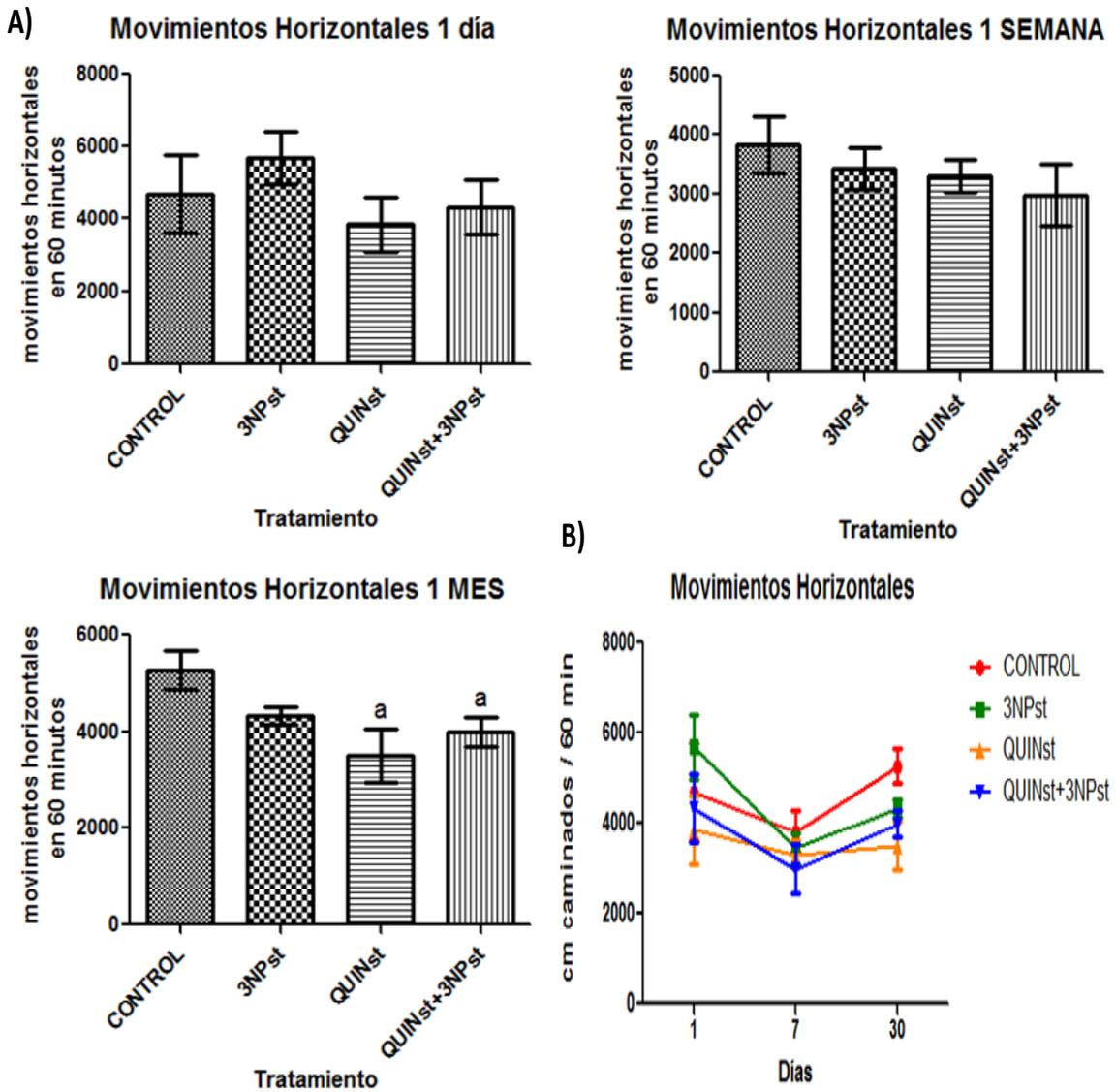


Fig. 8 Efecto de la administración subtóxica y conjunta de QUIN y 3-NP sobre los movimientos horizontales en ratas. La evaluación de la distancia total recorrida fue registrada 1, 7 y 30 días después de la última administración de la toxina correspondiente – solución salina i.p e i.e.; QUINst + 3-NPst (40 nmol/ μ L, i.e y 9 mg/Kg 1 μ L/hora en 7 días, minibomba respectivamente); 3-NP (9 mg/Kg, i.p.); QUIN (40 nmol/ μ L, i.e.) –. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de seis ratas por grupo. A) ^adiferente a Control; $p < 0.05$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. B) ANOVA de dos vías, donde hubo una diferencia significativa entre tiempos ($p < 0.05$).

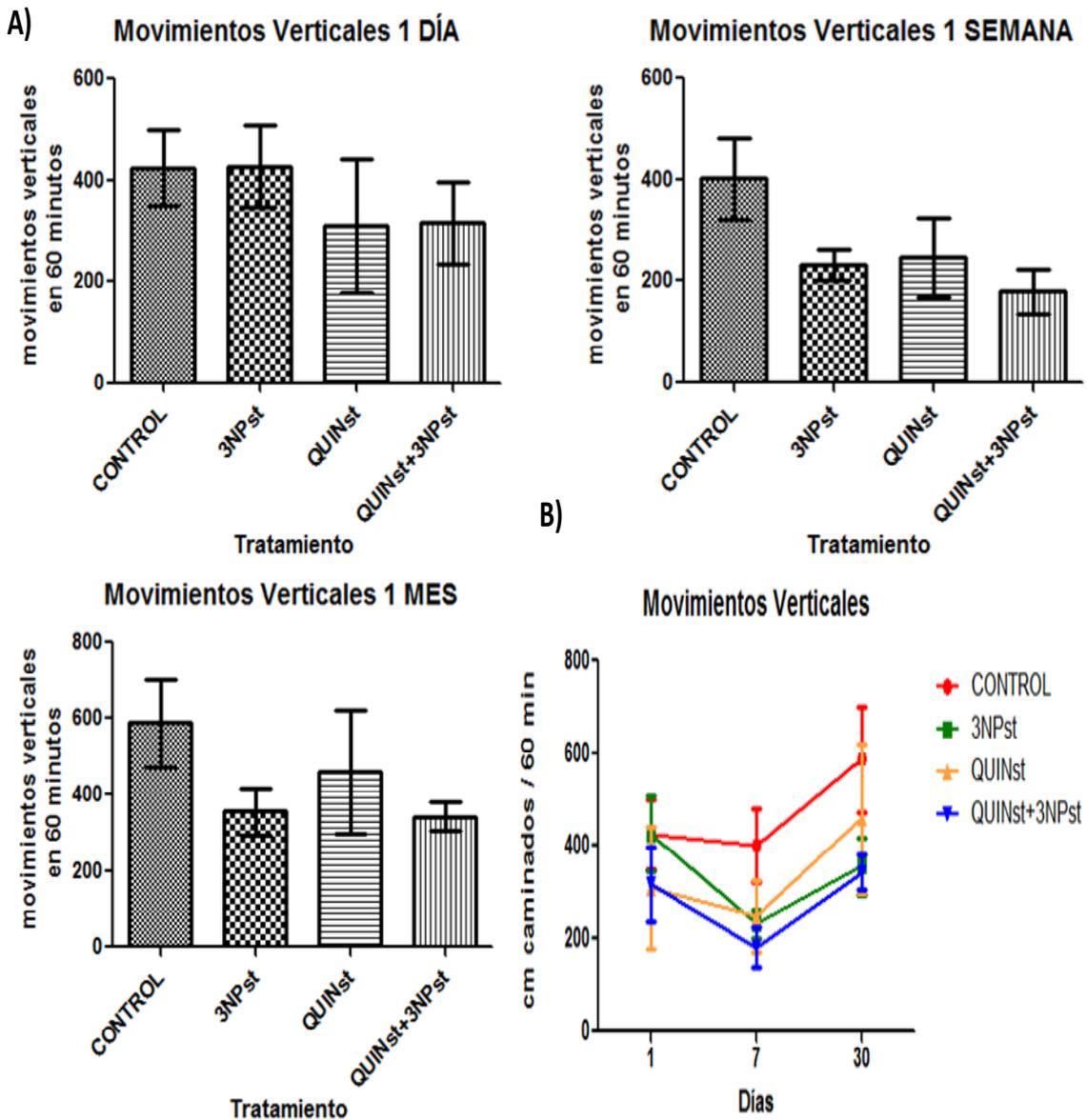


Fig. 9 Efecto de la administración subtóxica y conjunta de QUIN y 3-NP sobre los movimientos verticales en ratas. La evaluación de la distancia total recorrida fue registrada 1, 7 y 30 días después de la última administración de la toxina correspondiente – solución salina i.p e i.e.; QUINst + 3-NPst (40 nmol/ μ L, i.e y 9 mg/Kg 1 μ L/hora en 7 días, minibomba respectivamente); 3-NP (9 mg/Kg, i.p.); QUIN (40 nmol/ μ L, i.e.) –. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de seis ratas por grupo. ANOVA de una vía. B) ANOVA de dos vías, donde hubo una diferencia significativa entre tratamientos y tiempo ($p < 0.05$).

De la misma forma que en las pruebas anteriores, la evaluación de la conducta motora se desarrolló en los modelos experimentales de excitotoxicidad y de déficit energético evocados por la administración de dosis tóxicas de QUIN y 3-NP, respectivamente. Después de 30 días de administradas las toxinas se pudo observar que, en general, todos los patrones cinéticos (distancia total recorrida, movimientos horizontales y verticales) presentaron una disminución en sus respectivos marcadores, siguiendo unas tendencias parecidas a las ya reportadas en trabajos anteriores (Tabla 2).

		3-NP			QUIN			QUINst+3NPst		
		1	7	30	1	7	30	1	7	30
Efecto (con respecto al control)	Días									
	Distancia Total Recorrida ± SEM	178% ±62%	149% ±41% *	53% ±17%	48% ±10%	14% ±5% *	91% ±30%	68% ±17%	26% ±7% *	76% ±21%
	Movimientos Horizontales ± SEM	170% ±61%	163% ±16% ***	78% ±18%	90% ±24%	74% ±14%	99% ±31%	151% ±37%	66% ±5%	89% ±11%
	Movimientos Verticales ± SEM	108% ±42%	227% ±72%	68% ±25%	39% ±19%	106% ±19%	32% ±11% *	91% ±34%	69% ±13%	89% ±18%

Tabla 2. Se muestra la diferencia en porcentajes de tres marcadores de conducta motora, con respecto al grupo control, de tres diferentes modelos de daño neuronal – modelo excitotóxico evocado por ácido quinolínico (QUIN); modelo de déficit energético evocado por ácido 3-nitropropiónico (3-NP), y modelo de facilitación tóxica evocado por la utilización conjunta de QUIN y 3-NP – tomados en tres diferentes tiempos (1, 7 y 30 días). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Hallazgos Inmunohistoquímicos

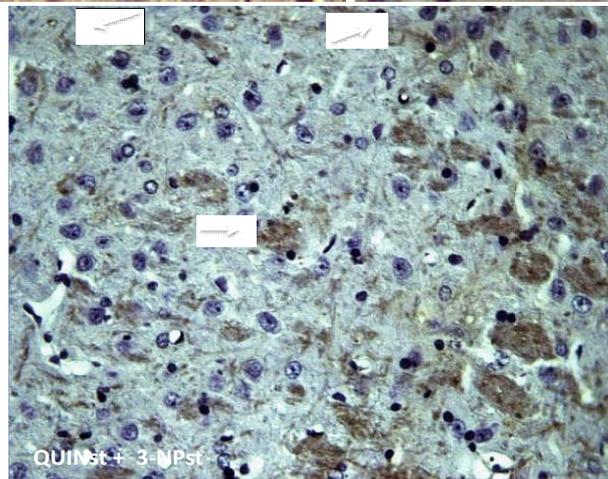
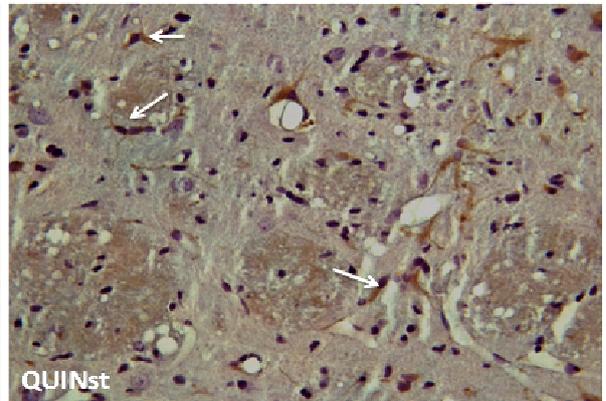
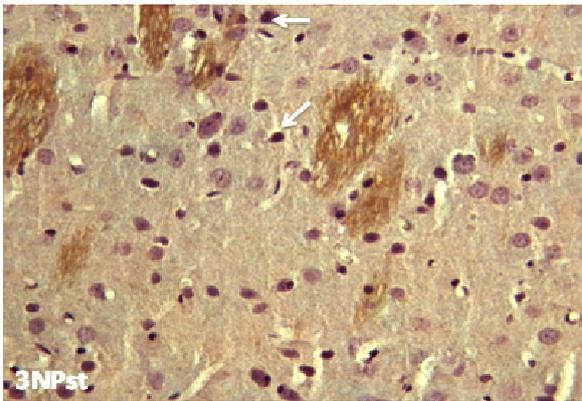
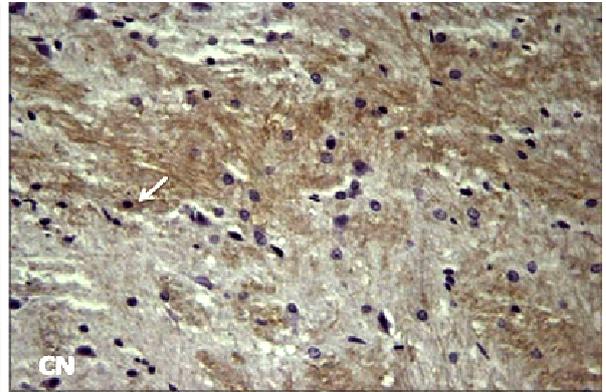
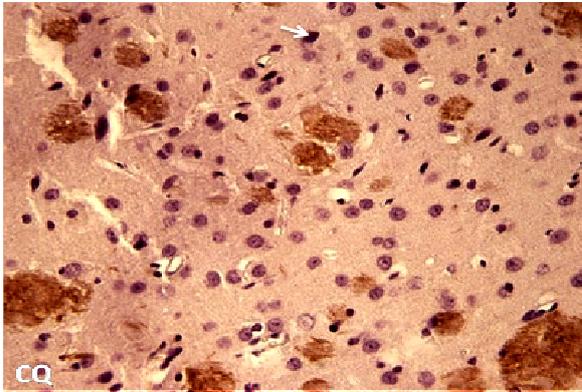
Con el propósito de evaluar el nivel de inflamación y daño celular en el tejido nervioso de cada uno de los grupos experimentales, se llevó a cabo la determinación inmunohistoquímica de algunos marcadores inflamatorios, como son la Interleucina-6 (IL-6), el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), así como la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), empleada como marcador morfológico de gliosis reactiva. Todas las pruebas inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo un mes después de la administración de las toxinas.

Para homogeneizar los resultados del conteo de células reactivas de cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos por separado en los grupos controles (CQ –inyección i.e. de solución salina – y CN – inyección i.p. de solución salina –), los datos resultantes del conteo fueron obtenidos promediando los datos por separado de cada grupo control. La inmunoreactividad presente en estos grupos controles pudo ser debida a la lesión mecánica y/o al estrés inducidos por la inyección intraestriatal o intraperitoneal de solución salina.

Activación glial inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP

Una abundante activación glial fue evidente en los grupos tratados con dosis subtóxicas de QUIN (QUINst) y 3-NP (3-NPst), así como en el grupo tratado con la combinación de dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP (QUINst + 3-NPst) (Fig. 10a). Estas observaciones fueron confirmadas por análisis cuantitativos (Fig. 10b) mostrando que la inmunoreactividad basal contra GFAP mostrada en los grupos controles fue significativamente potenciada en el grupo QUINst (138 % por arriba del control), así como también en los grupos 3-NPst y QUINst + 3-NPst, aunque en menor cantidad (72 % y 66 % arriba del control, respectivamente). QUINst tuvo una diferencia significativa con respecto a 3-NPst y QUINst + 3-NPst (diferencias en relación al número de células reactivas a GFAP); esto indica que QUINst, aparte de tener mayor activación glial que el control, tiene mayor activación glial que 3-NPst y la combinación de las toxinas.

a)



b)

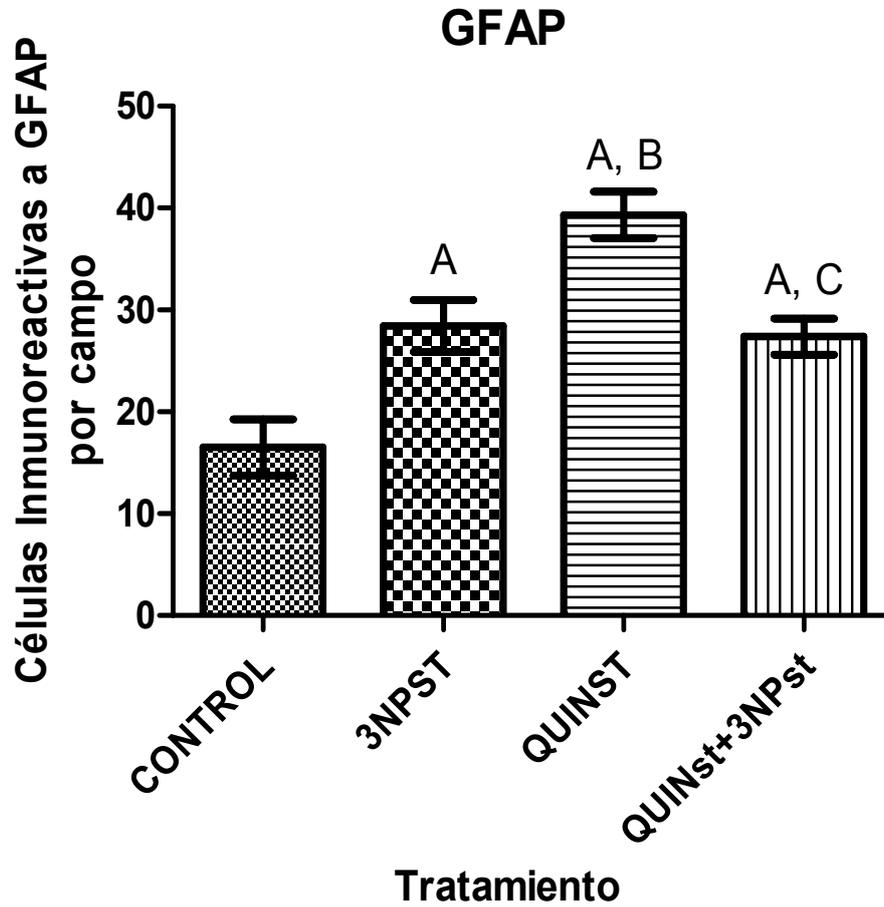


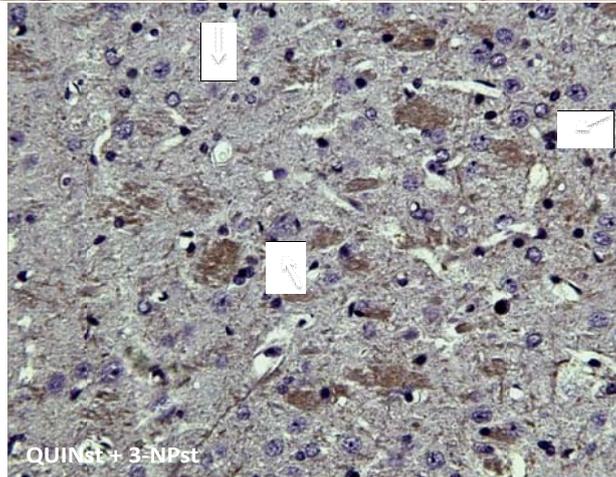
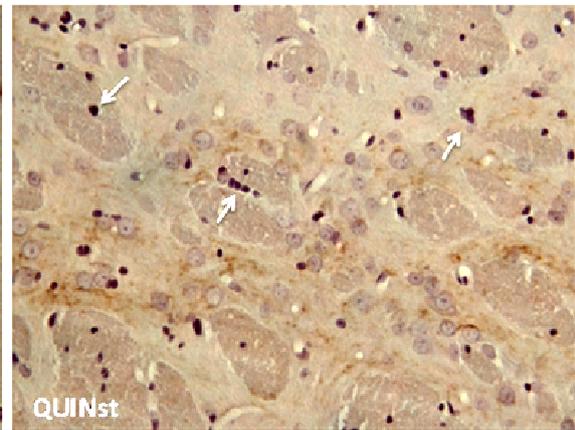
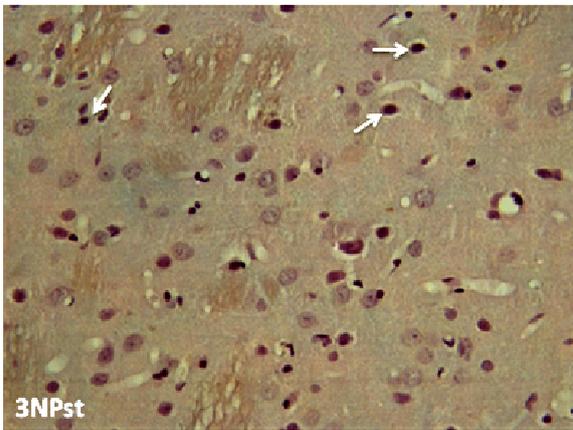
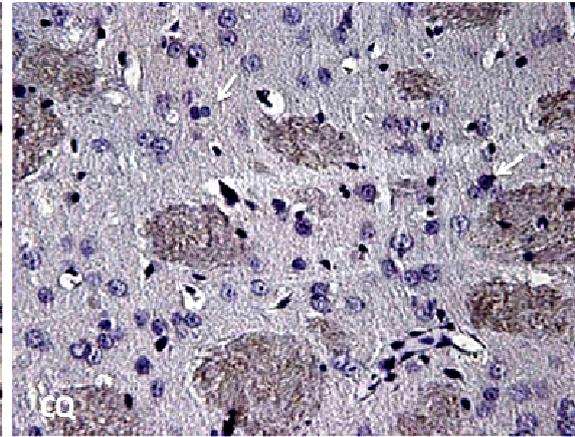
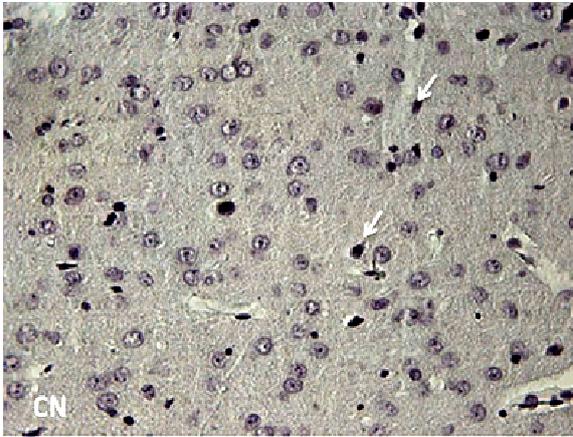
Fig. 10 Inmunoreactividad contra la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) inducida por la administración conjunta de QUIN + 3-NP. 30 días después de la administración de las toxinas los cerebros de las ratas fueron procesados y se obtuvieron secciones coronales de 7 μ m, las cuales fueron incubadas toda la noche con un anticuerpo anti-GFAP; posteriormente fueron contrateñidas con hematoxilina y observadas con un microscopio óptico. En a) se observan las células inmunoreactivas a GFAP. Las flechas señalan las células positivas a GFAP (magnificación 40X). En b) se muestra el conteo de células inmunoreactivas a GFAP por campo. El promedio \pm error estándar de 10 campos seleccionados de cinco secciones por cerebro (tres cerebros por grupo fueron utilizados). ^Adiferente a control, ^Bdiferente a 3-NPst, ^Cdiferente a QUINST; $p < 0.01$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Expresión inmunohistoquímica de iNOS inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP

La inmunoreactividad contra iNOS en el tejido estriatal de los animales utilizados está representada en la Figura 11a. Comparada con los grupos control, el número de células inmunoreactivas a iNOS aumentó significativamente en el grupo de QUINst + 3-NPst.

Los datos numéricos del conteo de células inmunoreactivas (Fig. 11b) apoyaron las observaciones hechas acerca del incremento en la inmunoreactividad celular contra iNOS en el estriado de los animales tratados con QUIN y 3-NP de manera conjunta (43 % por arriba del control). Con respecto a los grupos subtóxicos, no se observó diferencia significativa – QUINst (23 % por arriba del control); 3-NPst (7 % por arriba del control) –.

a)



b)

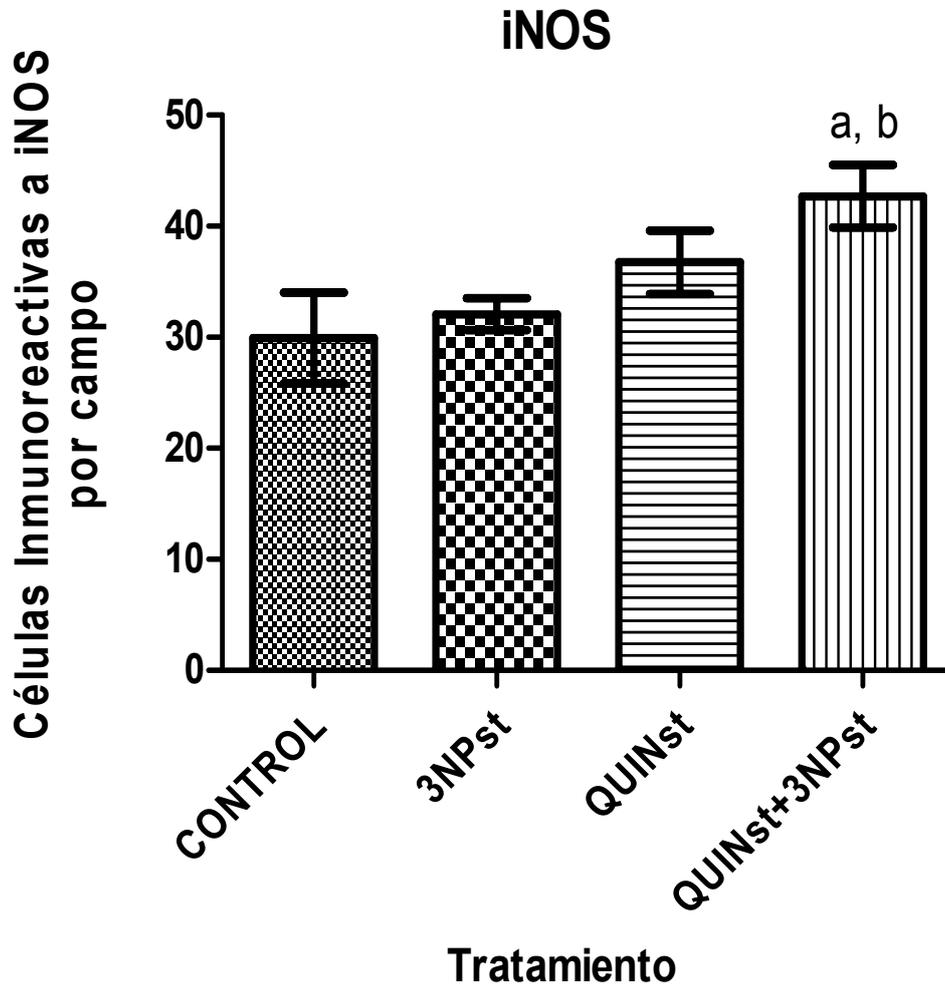


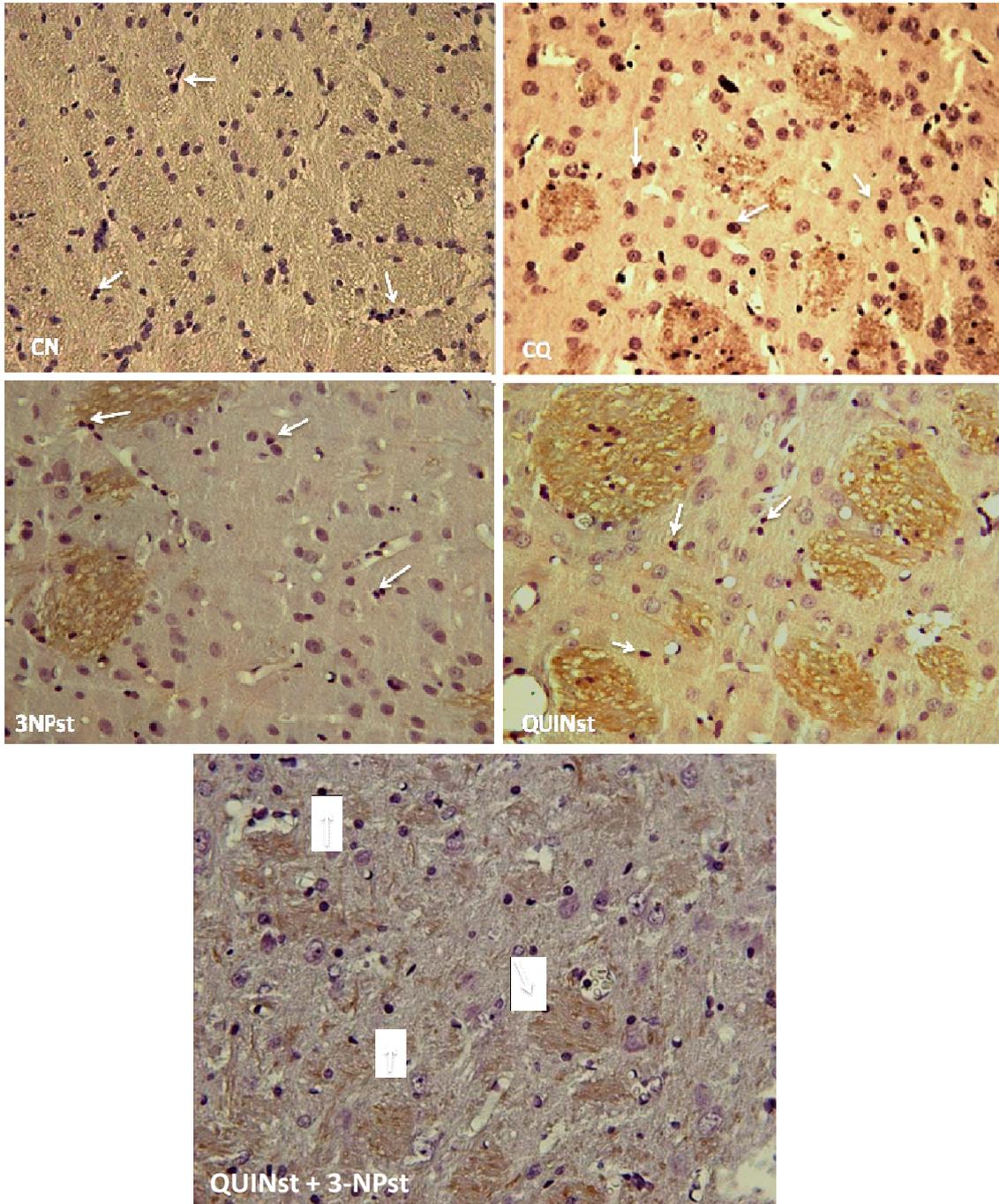
Fig. 11 Inmunoreactividad contra la enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), estimulada por diferentes tratamientos con ácido 3-nitropropionico (3-NP) y ácido quinolínico (QUIN) en estriado de rata. 30 días después de la administración de las toxinas los cerebros de las ratas fueron procesados y se obtuvieron secciones coronales de 7 μ m, las cuales fueron incubadas toda la noche con un anticuerpo anti-iNOS; posteriormente fueron contrateñidas con hematoxilina y observadas con un microscopio óptico. En a) se observan las células inmunoreactivas a iNOS. Las flechas señalan las células positivas a iNOS (magnificación 40X). En b) se muestra el conteo de células inmunoreactivas a iNOS por campo. El promedio \pm error estándar de 10 campos seleccionados de cinco secciones por cerebro (tres cerebros por grupo fueron utilizados). ^adiferente a control, ^bdiferente a 3-NPst; $p < 0.05$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Expresión inmunohistoquímica de IL-6 inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP

Se observó un gran aumento en la reactividad celular a IL-6 en el grupo QUINSt + 3-NPst, donde además se aprecia un ligero daño al neuropilo. Por su parte, QUINSt y 3-NPst no mostraron un cambio evidente en la reactividad celular con respecto a los grupos controles (Fig.12a).

Los datos cuantitativos apoyan lo expuesto en el párrafo anterior en relación al incremento de la inmunoreactividad de las células a IL-6 en el grupo de QUINSt + 3-NPst (65 por % arriba del control); en cuanto a los grupos subtóxicos no hubo diferencia con respecto al grupo control(Fig. 12b).

a)



b)

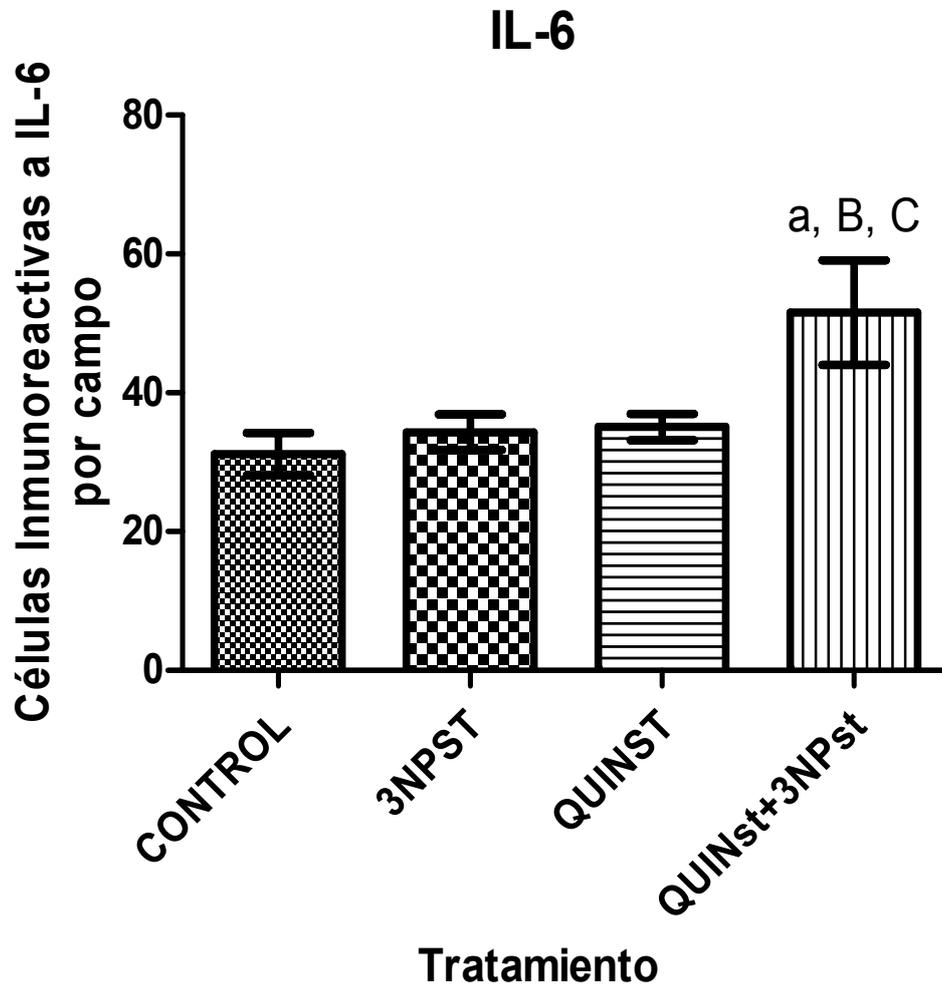


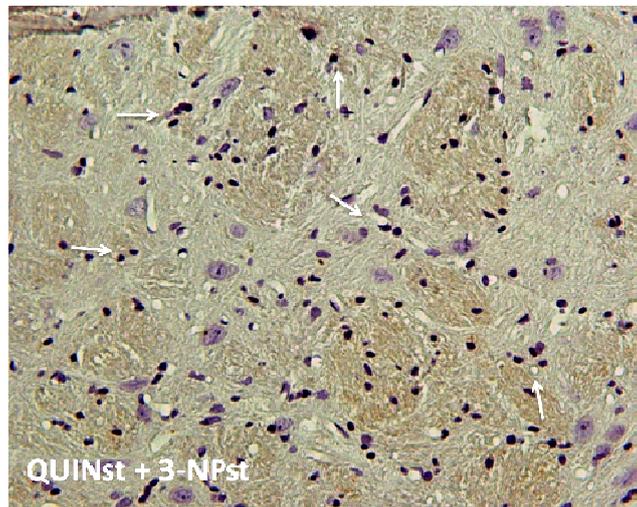
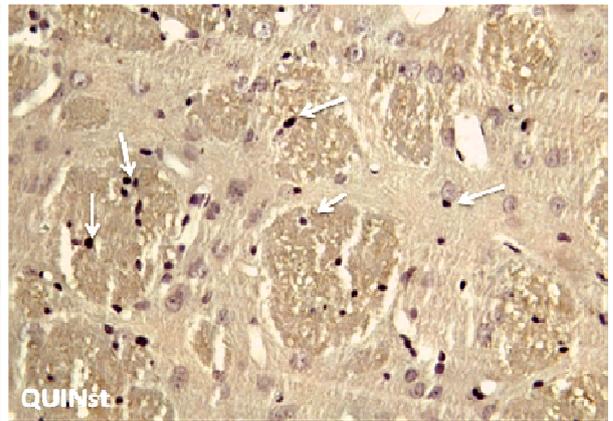
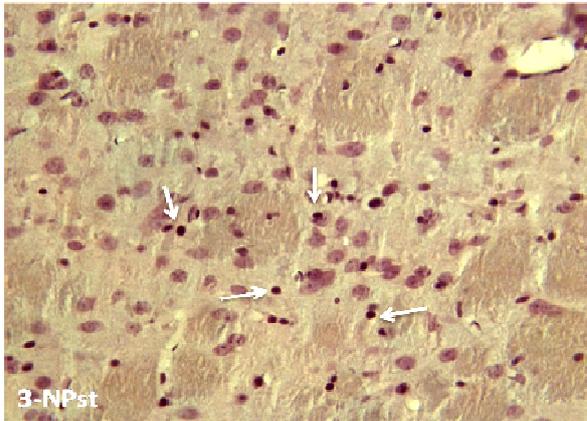
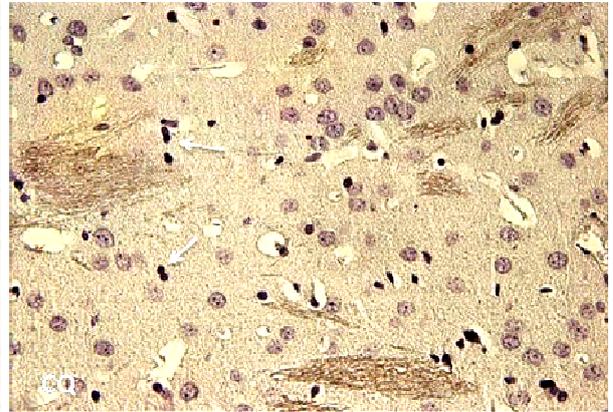
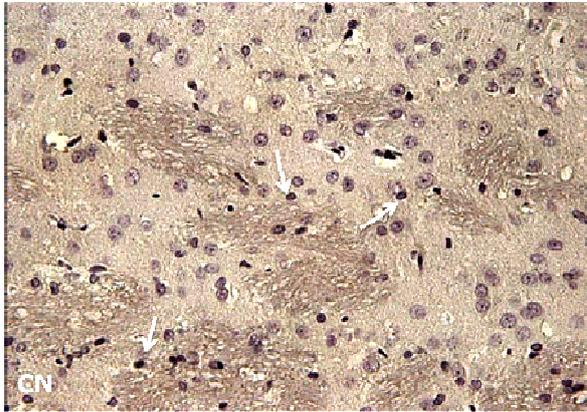
Fig. 12 Inmunoreactividad contra Interleucina-6 (IL-6), estimulada por diferentes tratamientos con ácido 3-nitropropionico (3-NP) y ácido quinolínico (QUIN) en estriado de rata. 30 días después de la administración de las toxinas los cerebros de las ratas fueron procesados y se obtuvieron secciones coronales de 7 μm , las cuales fueron incubadas toda la noche con un anticuerpo anti-IL-6; posteriormente fueron contrateñidas con hematoxilina y observadas con un microscopio óptico. En a) se observan las células inmunoreactivas a IL-6. Las flechas señalan las células positivas a IL-6 (magnificación 40X). En b) se muestra el conteo de células inmunoreactivas a IL-6 por campo. El promedio \pm error estándar de 10 campos seleccionados de cinco secciones por cerebro (tres cerebros por grupo fueron utilizados).^adiferente a control, $p < 0.05$;^Bdiferente de 3-NPst, ^Cdiferente de QUINSt; $p < 0.01$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Expresión inmunohistoquímica de TNF α inducida por tratamientos experimentales con QUIN y 3-NP

Como resultado de la administración de dosis subtóxicas de manera conjunta de 3-NP y QUIN, la inmunoreactividad para TNF α se vió considerablemente aumentada con respecto al los grupos a los que se les administró con solución salina y dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP por separado. Los grupos subtóxicos (QUIN_{st} y 3-NP_{st}) no presentaron una diferencia evidente en la inmunoreactividad celular con respecto a los grupos control (Fig. 13a).

En relación a lo arriba afirmado, el análisis cuantitativo de las células inmunoreactivas a TNF α arrojó evidencia de que el grupo QUIN_{st} + 3-NP_{st} tiene 79 % más células reactivas a TNF α que el grupo control. Los grupos subtóxicos empleados por separado no mostraron cambios significativos con respecto al control (Fig. 13b).

a)



b)

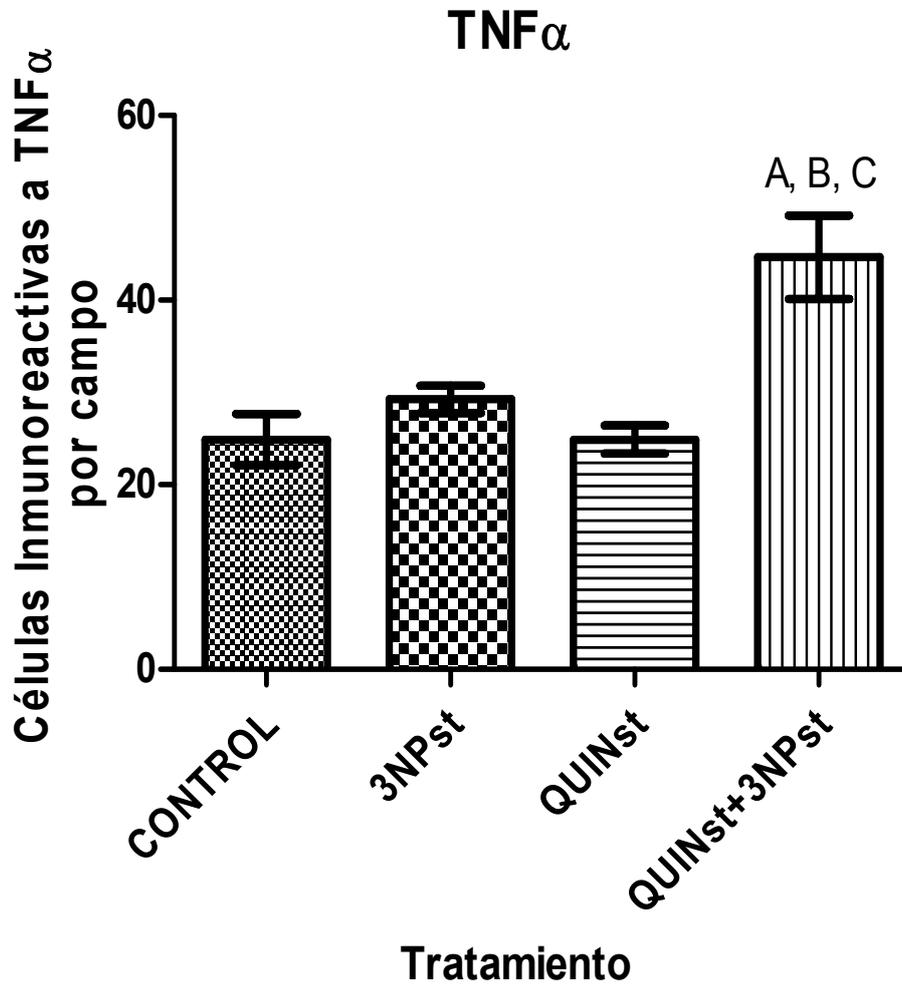


Fig. 13 Inmunoreactividad contra elFactor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), estimulada por el ácido 3-nitropropionico (3-NP) y el ácido quinolínico (QUIN) en estriado de rata. 30 días después de la administración de las toxinas los cerebros de las ratas fueron procesados y se obtuvieron secciones coronales de 7 μ m, las cuales fueron incubadas toda la noche con un anticuerpo anti-TNF α ; posteriormente fueron contrateñidas con hematoxilina y observadas con un microscopio óptico. En a) se observan las células inmunoreactivas a TNF α . Las flechas señalan las células positivas a TNF α (magnificación 40X). En b) se muestra el conteo de células inmunoreactivas a TNF α por campo. El promedio \pm error estándar de 10 campos seleccionados de cinco secciones por cerebro (tres cerebros por grupo fueron utilizados). ^A diferente a control, ^B diferente a 3-NPst, ^C diferente a QUINst; $p < 0.0001$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Cambios en los Niveles Estriatales de GABA

La Figura 14 muestra el efecto que tiene la administración conjunta de QUIN y 3-NP (dosis subtóxicas por separado y su combinación) sobre los niveles del ácido- γ -aminobutírico (GABA) en el cuerpo estriado de las ratas. La administración conjunta de dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP provoca una disminución de aproximadamente el 37 % de la concentración de GABA con respecto al grupo tratado con solución salina. En cuanto a los grupos tratados con dosis subtóxicas por separado, no mostraron diferencia significativa comparada con el control.

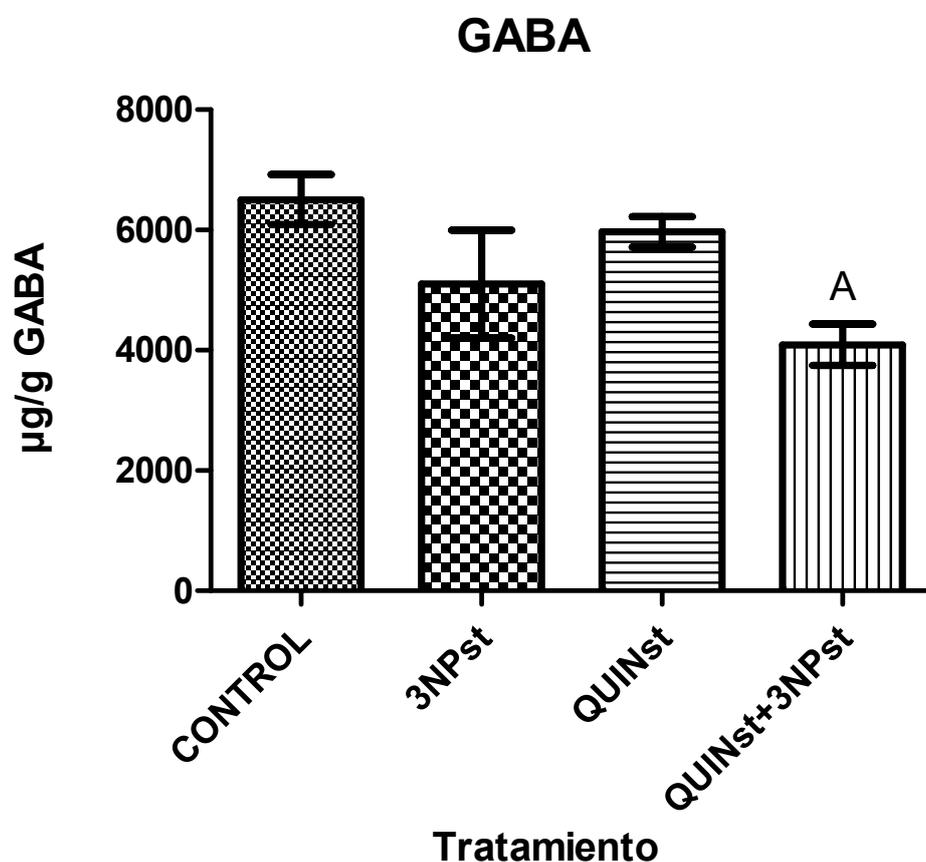


Fig. 14 Efecto de los diferentes tratamientos con QUIN y 3-NP (dosis subtóxicas y dosis administradas conjuntamente) sobre los niveles estriatales del ácido- γ -aminobutírico (GABA). 30 días después de la administración de las toxinas, el tejido estriatal de las ratas tratadas fue obtenido y preparado para un análisis cromatográfico del contenido total de GABA. ^A diferente de control; $p < 0.01$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Resumen de datos

Comparación de los modelos de excitotoxicidad (QUIN) y de déficit energético (3-NP) con el modelo conjunto (modelo de facilitación tóxica, QUINst + 3-NPst)

Al igual que la conducta motora, los marcadores inflamatorios y los niveles de GABA fueron evaluados en los modelos experimentales de excitotoxicidad y de déficit energético evocados por la administración de dosis tóxicas de QUIN y 3-NP respectivamente. Después de 30 días de administradas las toxinas, se observó que los niveles de GABA disminuyeron de forma significativa en el modelo de déficit energético(3-NP) y en el modelo conjunto (QUINst+3NPst). Con respecto al modelo excitotóxico(QUIN), se observó que la disminución en los niveles GABAérgicos no fue significativa.

En cuanto a los marcadores de activación glial e inflamación se observó que la inmunoreactividad aumentó en los tres modelos, tanto para GFAP como para iNOS, IL-6 y TNF α , pero sin diferencias significativas entre si.

		3-NP	QUIN	QUINst+3NPst
Efecto (con respecto al control)	Días	30	30	30
	GABA ± SEM	43% ±11% ***	91% ±8%	65% ±9% *
	GFAP ± SEM	385% ±189%	552% ±292%	326% ±164%
	iNOS ± SEM	153% ±29%	222% ±47%	172% ±29%
	IL-6 ± SEM	236% ±68%	246% ±61%	177% ±35%
	TNFα ± SEM	228% ±54%	262% ±50%	187% ±44%

Tabla 3. Se muestra la diferencia en porcentajes, con respecto al grupo control, de los marcadores inmunohistoquímicos (GFAP, iNOS, IL-6 y TNFα) y moleculares (GABA) evaluados de tres diferentes modelos de daño neuronal – modelo excitotóxico evocado por ácido quinolínico (QUIN); modelo de déficit energético evocado por ácido 3-nitropropiónico (3-NP), y modelo de facilitación tóxica evocado por la utilización conjunta de QUIN y 3-NP – tomados 30 días después de la administración de las toxinas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

DISCUSIÓN

Las alteraciones motoras provocadas por QUIN y 3-NP están relacionadas a los eventos excitotóxicos y al déficit energético producidos por dichas toxinas, lo cual afecta la función de las células nerviosas, hasta el punto de ser incapaces de integrar la mayoría de las funciones cinéticas. Estos eventos tóxicos son caracterizados por la formación de ERO/ERN, activación de componentes pro-inflamatorios y astrogliosis (Pérez-De La Cruz *et al.*, 2008), denotando muerte celular.

Los hallazgos conductuales de este trabajo muestran que la administración conjunta de dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP provoca la disminución de la actividad locomotora después de una semana de administradas las toxinas, y ésta persiste hasta los 30 días, en los cuales también se observó una disminución en los patrones de locomoción horizontal, una conducta incontrolada como movimientos estereotipados o extensión de la rigidez en las patas traseras, de acuerdo a reportes previos (Silva-Adaya *et al.*, 2008). Estos eventos pudieron ser debidos a la pérdida de neuronas GABAérgicas, lo cual se ve reflejado en los niveles disminuidos de GABA. Estos resultados pueden explicarse mediante un proceso de facilitación tóxica, lo cual quiere decir que la poca toxicidad evocada por una toxina debió facilitar el mecanismo de toxicidad de la otra. Este evento se ha explicado como una vulnerabilidad adicional al glutamato endógeno que presentan las neuronas debido a un defecto en el metabolismo energético mitocondrial que puede secundariamente llevar a la muerte neuronal excitotóxica. Con un metabolismo redox disminuido y una parcial despolarización de la membrana celular, los canales iónicos del receptor NMDA pueden ser más fácilmente activados (Beal, 1992). Ciertos trabajos similares en diseño al presente, en los cuales se utilizan de manera conjunta agonistas del receptor NMDA (como NMDA, AMPA y L-Glutamato) y toxinas mitocondriales (como el malonato), esto sugiere que existe un evento de potenciación o sinergismo al administrar dosis subtóxicas de dichas toxinas, tomando como marcador el grado de lesión estriatal (Greene y Greenamyre, 1995; Bazzett *et al.*, 1996). Adicionalmente, otros

procesos envueltos en la regulación del calcio intracelular pueden verse afectados (Beal, 1992), como lo explica el trabajo de Jacquard y colaboradores del 2006, en el cual se argumenta que una moderada activación del receptor NMDA combinada con defectos no tóxicos de la SDH mitocondrial (inhibición de la SDH >35%) pueden disparar de manera sinérgica una degeneración estriatal masiva, lo cual evidentemente dará como resultado alteraciones en la conducta motora. Los resultados de este trabajo no muestran una potenciación o un evento sinérgico en la actividad locomotora, como podría haberse supuesto, tomando en cuenta el trabajo de Jacquard, sino un evento de facilitación tóxica, lo cual puede ser explicado por la dosis subtóxica de 3-NP administrada (9 mg/Kg en 7 días), que no produce una inhibición suficiente de la SDH para evocar un evento sinérgico, como lo argumenta Jacquard en su trabajo.

En relación a los grupos tratados con dosis subtóxicas, se observó que el grupo de QUINst provocó la disminución de la actividad locomotora después de 7 días de administrada la toxina y hasta después de 30 días, donde también se distinguió una disminución en los patrones de locomoción horizontal. En cuanto al grupo de 3-NPst se observó una disminución en la actividad locomotora después de 30 días de administrada la toxina. Como se pudo observar, los efectos provocados en el grupo QUINst son prácticamente iguales a los efectos del grupo QUINst+3NPst, lo cual nos haría pensar que los patrones de toxicidad generados por el modelo conjunto es debida mayoritariamente al QUIN, pero el hecho de que hubiese una mayor disminución de la actividad locomotora en QUINst+3NPst después de una semana de administradas las toxinas, aunado a que el 3-NPst también disminuyó la actividad motora (hasta los 30 días), nos hace pensar que efectivamente existió un evento diferente que aumentó la toxicidad en el modelo conjunto, ya que las dosis subtóxicas provocaron un evento tóxico (mínimo) en sus respectivos grupos experimentales, solo que dependiente del tiempo, lo cual a su vez pudo ser debido a que los mecanismos de protección celulares se vieron superados. De cualquier forma, los efectos de cada uno de los modelos experimentales existentes mediante la utilización de QUIN y/o 3-NP pueden ser similares entre sí en algunos

marcadores, mientras que en otros no, lo que nos hace pensar en primera instancia, en mecanismos tóxicos diferentes.

Con respecto a los hallazgos conductuales relacionados con la administración tóxica de QUIN y 3-NP, se puede decir que concuerdan con los datos ya reportados en diferentes publicaciones (Shear *et al.*, 1998; Silva-Adaya *et al.*, 2008; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2008), con un régimen experimental similar al del presente trabajo, y las diferencias existentes pueden ser debidas a que hay una gran variedad de métodos experimentales de administración y dosificación de las toxinas, los cuales generan patrones locomotores diferentes. Así mismo, otro punto a resaltar es el lapso de tiempo de registro de la conducta motora utilizado en los diferentes reportes, el cual en su mayoría se dió durante una o dos semanas, mientras que en el presente trabajo se evaluó durante un mes, lo cual dió más tiempo para un mayor daño estriatal.

El modelo de uso conjunto de QUIN y 3-NP ha sido poco estudiado. Algunos marcadores evaluados en él son la peroxidación lipídica y la funcionalidad mitocondrial en modelos *in vitro* (Elinos-Calderón *et al.*, 2009; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2008; Silva-Adaya *et al.*, 2008; Jacquard *et al.*, 2006). En condiciones *in vivo*, Jacquard y colaboradores evaluaron algunos marcadores anatómicos e histoquímicos, así como la posible hipersensibilización de los receptores NMDA en este modelo de administración conjunta; ya en el 2008, Silva-Adaya y colaboradores evaluaron la conducta de rotación y los niveles estriatales de GABA.

Se sabe que los modelos excitotóxicos de daño neuronal semejan de mejor manera los estados tempranos de hiperactividad de diferentes patologías como los de la enfermedad de Huntington (EH), mientras que el 3-NP mimetiza de mejor forma los estados hipocinéticos tardíos y posiblemente el inicio juvenil de la EH (Borlongan *et al.*, 1994). En este trabajo, nuestros resultados sugieren que el modelo conjunto semeja más los estados hipocinéticos que los hipercinéticos.

Por otra parte, procesos de activación glial e inflamación se ven relacionados con la degeneración neuronal – inducida por los eventos de excitotoxicidad, formación de ERO/ERN y déficit energético evocados por la administración de QUIN y 3-NP – causante de las alteraciones motoras. El ingreso anormal de Ca^{2+} evocado por la sobre-estimulación de los receptores NMDA y la disminución en los niveles de ATP son los principales generadores de reacciones inflamatorias y astrogliosis (Pérez-De La Cruz y Santamaría, 2007).

Con el fin de estimar el nivel de activación glial e inflamación evocado por el modelo conjunto (QUINst+3NPst) propuesto en este trabajo, se evaluó la expresión inmunohistoquímica de GFAP, TNF α , IL-6 e iNOS. Primeramente, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), es una proteína de los filamentos intermedios comúnmente encontrada en astrocitos, y está involucrada en diferentes funciones celulares como la estructura y movimiento celular, comunicación celular y funcionamiento de la barrera hematoencefálica. El aumento en su expresión es evidente en diferentes situaciones comúnmente referidas como activación astrocítica. En este sentido, es aceptado que varias enfermedades cuentan con una proliferación glial, lo cual es causado por la sobrerregulación del GFAP para restablecer los márgenes gliales alrededor del núcleo central del tejido (González-Cortés *et al.*, 2008). Los reportes existentes sobre la activación glial ejercida tanto por QUIN como por 3-NP muestran que dosis tóxicas de QUIN (240 nmol/ μ L) producen una intensa reactividad contra GFAP, además de un extenso daño al neuropilo y aumento en la cantidad de núcleos picnóticos (Silva-Adaya *et al.*, 2008). Por su parte, el 3-NP provoca una expresión masiva de GFAP con dosis subcrónicas (7.5 mg/Kg por 2 días) y una pérdida de células positivas para GFAP con una intoxicación crónica (Deshpande *et al.*, 1997), lo cual se confirma por la disminución de la inmunoreactividad a GFAP y activación microglial, así como un aumento en células apoptóticas (Villarán *et al.*, 2008); todos estos resultados contenidos en células estriatales. Los hallazgos en este trabajo muestran que hay un aumento en el número de células reactivas a GFAP en el grupo QUINst+3NPst, lo cual nos habla de una proliferación glial debida a la toxicidad provocada por la administración conjunta a dosis subtóxicas, lo cual está generando un modelo de

facilitación tóxica. Interesantemente, los grupos administrados con dosis subtóxicas de QUIN o de 3-NP, por separado, también muestran un aumento en la inmunoreactividad celular a GFAP, lo cual pudo ser debido a que el aumento en la proliferación glial es un proceso de protección celular muy sensible, y se presenta con niveles de estrés mínimos. Con respecto a los grupos administrados con dosis tóxicas de QUIN o 3-NP se pudo observar que tuvieron una inmunoreactividad contra GFAP acorde a los datos ya publicados (Silva-Adaya *et al.*, 2008; González-Cortés *et al.*, 2008).

Otra molécula involucrada en eventos inflamatorios es el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α). Este factor es un polipéptido sintetizado y secretado por células inmunes activadas, así como por astrocitos y microglía, aunque también puede ser encontrado como una molécula transmembranal sobre la superficie de macrófagos y células T activadas. El TNF α tiene un papel prominente en reacciones inflamatorias ya que incrementa la permeabilidad endotelial, así como la expresión de varias moléculas de adhesión en estas células, facilitando de esta forma la adhesión de neutrófilos, monocitos y linfocitos a la superficie capilar. El TNF α también es responsable de la estimulación de varias células para la posterior liberación de citocinas (IL-1, IL-6, G-CSF/GM-CSF y TNF α). La expresión del TNF α en el cerebro se ve excepcionalmente aumentada después del desarrollo de un estrés patológico, el cual puede ser producido por lesiones cerebrales, isquemia y/o eventos infecciosos. La microglía y los astrocitos son activados como resultado de cambios en el microambiente producido por estímulos nocivos; posteriormente, estas células disparan la sobreproducción de TNF α y otras citocinas pro-inflamatorias – IL-1 e IL-6 – como parte de una respuesta inflamatoria intrínseca del SNC (González y Santamaría, 2007).

Se ha reportado que la administración sub-crónica de 3-NP (15 mg/Kg/7 días) causa el incremento en los mediadores inflamatorios TNF α y óxido nítrico (Ahuja *et al.*, 2008), mientras que la inflamación mediada por la toxicidad inducida por QUIN, aunque poco estudiada, también ha sido relacionada a la expresión de citocinas como el TNF α en astrocitos (Pérez-De La Cruz y Santamaría, 2007).

Respecto a los resultados logrados en este trabajo, se observó que los grupos subtóxicos mantuvieron una inmunoreactividad celular contra TNF α estadísticamente muy parecida al grupo control, mientras que el grupo de QUINst+3-NPst presentó un aumento en dicha reactividad de casi el doble con respecto al grupo control, lo cual nos habla de la activación de la microglia y los astrocitos como parte de una reacción inflamatoria debida a la toxicidad evocada por la utilización conjunta de ambas toxinas. El resultado descrito para este marcador es ligeramente diferente a los descritos anteriormente, ya que la consecuencia del patrón de toxicidad inducida en este trabajo demuestra una mayor diferencia del grupo conjunto con respecto a los grupos comparados (control y subtóxicos), lo cual puede considerarse como una respuesta sinérgica por parte de las toxinas, a diferencia de los marcadores anteriores en los cuales hubo una facilitación tóxica; sin embargo, como ya ha sido mencionado, los diferentes marcadores estudiados pueden responder de manera diferente a distintos tratamientos.

De forma esperada, los resultados obtenidos en este trabajo en relación a la inmunoreactividad celular contra IL-6 evocada por los grupos experimentales utilizados, concuerdan con los observados para TNF α , teniendo en cuenta que este factor estimula la liberación de IL-6; se observó que el grupo QUINst+3-NPst tuvo un aumento en la reactividad celular contra IL-6 de casi el doble con respecto al control, y los grupos subtóxicos permanecieron sin cambio aparente. La Interteucina-6 (IL-6) es un polipéptido sintetizado y secretado por varias células, abarcando microglia y astrocitos, en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo otras citocinas como IL-1, TNF α , TNF- β , LPS, etc. Ha sido ampliamente documentado que la síntesis de IL-6 en el SNC se dispara en respuesta a daños y/o infecciones; sin embargo, algunos reportes describen la expresión de esta citocina bajo condiciones fisiológicas. La microglia humana también produce IL-6 en respuesta a lipopolisacáridos y TNF α , probablemente debido a la activación de vías de transducción responsables de la señalización de la proteína cinasa C (PKC) o ceramida, lo que resulta en la activación del factor de transcripción NF- κ B (González y Santamaría, 2007). Previos reportes señalan que

la inyección de QUIN (240 nmol/ μ L) provoca un aumento considerable en la expresión de IL-6 en el estriado, además de una regulación masiva, pero transitoria, de ARN mitocondrial de IL-6 (González-Cortez *et al.*, 2008; Schiefer *et al.*, 1998). Los datos obtenidos en este trabajo con respecto a la utilización de dosis tóxicas de QUIN o 3-NP concuerdan con los reportes existentes.

El ultimo marcador de eventos inflamatorios utilizado en este trabajo es la inmunoreactividad celular contra la Sintasa de Óxido Nítrico inducible (iNOS). La iNOS es una enzima localizada en las células gliales (astocitos y microglia) y sintetiza óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina sin la participación del Ca^{2+} . La iNOS no se encuentra presente en el SNC bajo condiciones fisiológicas; ésta es inducida por lipopolisacárido (LPS) y algunas citocinas como el interferón- γ (IFN γ), TNF α e IL-1 β , las cuales a su vez actúan por medio de receptores específicos en la membrana celular. El NO producido por iNOS parece ser una llave mediadora para la muerte celular neuronal inducida por células gliales, ya que las altas concentraciones de NO conducen a la inhibición de la respiración celular, a la liberación rápida de glutamato por astrocitos y neuronas, y una muerte neuronal excitotóxica subsecuente. En particular, el NO parece ser un potente inhibidor de la respiración mitocondrial bajo condiciones *in vitro* debido a su unión reversible con la citocromo oxidasa en competencia directa con oxígeno, resultando en la reducción de la producción de energía (González y Santamaría, 2007). Los resultados arrojados por esta investigación apuntan a que la administración conjunta de dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP induce la síntesis de iNOS, lo que nos habla de un aumento en el NO, que como se mencionó anteriormente, puede promover la inhibición de la respiración celular; esta inhibición por la unión de NO con la citocromo oxidasa pudo generarse como un evento provocado por la mínima inhibición de la SDH por el 3-NP o la moderada excitotoxicidad evocada por QUIN, debido a la facilitación tóxica evocada por las dosis subtóxicas de las toxinas utilizadas. Los grupos de QUINst y 3-NPst no provocaron una síntesis evidente de iNOS. Los modelos tóxicos de QUIN y 3-NP evaluados en el presente trabajo mostraron una inducción de la síntesis de iNOS acorde a lo ya reportado

en algunos trabajos con estos modelos (González-Cortés *et al.*, 2008; Túnez *et al.*, 2010).

El aumento en los niveles de expresión de los cuatro diferentes marcadores pro-inflamatorios en el grupo de QUINst+3-NPst, donde se utilizaron conjuntamente dosis subtóxicas de ambas toxinas, puede ser explicado por un evento de facilitación tóxica, el cual es debido al suficiente aumento de Ca^{2+} intracelular evocado por la combinación del efecto producido por el ligero daño mitocondrial desatado por la inhibición de la SDH (<35 %), lo cual provoca un desbalance del Ca^{2+} intracelular, y éste aumenta debido a la moderada entrada de Ca^{2+} extracelular por la estimulación de los receptores NMDA. El aumento en el Ca^{2+} intracelular potencia la generación de radicales libres y dispara diversas vías metabólicas que pueden llevar a muerte celular (Jacquard *et al.*, 2006; Beal, 1992). Todos estos procesos van acompañados de diversos mecanismos celulares de protección en respuesta al daño tóxico primario; tal es el caso de la activación de células gliales e inflamación.

Con respecto al efecto que tuvo el régimen de administración de las toxinas en los diferentes grupos sobre los niveles estriatales del ácido γ -aminobutírico (GABA), se puede decir que el grupo con la administración conjunta de QUIN y 3-NP causó la disminución en estos niveles, lo cual indica la muerte de neuronas GABAérgicas; este evento no se presentó en los grupos de QUINst y de 3-NPst, lo cual nos permite inferir que hubo un evento de facilitación tóxica evocado por las dosis subtóxicas en el grupo de QUINst+3-NPst; este resultado concuerda con el descrito por Silva-Adaya en el 2008 y con los hallazgos conductuales, donde la disminución de la locomoción está ligada típicamente a pérdida de neuronas GABAérgicas. Este resultado también simula esta característica específica de la EH.

En dosis tóxicas, ambos compuestos provocan la degeneración de neuronas medianas GABAérgicas (Guyot *et al.*, 1997; Foster *et al.*, 1983). Este hecho fue recreado en este trabajo solo para el caso del modelo con 3-NP; para el modelo con QUIN los niveles estriatales de GABA no disminuyeron como sería lo previsto,

lo cual pudo ser debido a que la cuantificación cromatográfica de GABA se llevó a cabo al mes de administrada la toxina, tiempo en el cual pudo llevarse a cabo un evento de neurogénesis en el cuerpo estriado lesionado, a partir de células endógenas progenitoras capaces de generar nuevas neuronas para reemplazar la pérdida de estas (Tattersfield *et al.*, 2004; Collin *et al.*, 2005). Aunque poco probable, esta hipótesis es factible. De igual manera, los procesos de plasticidad estriatal pudieron haber conferido resistencia a las células estriatales, debido al hecho de que se emplearon dosis subtóxicas no letales para los modelos.

En el presente estudio se evaluaron las alteraciones en la conducta motora evocadas por el modelo conjunto, arrojando como resultado patrones hipocinéticos presentes a partir de los siete días de administradas las toxinas; sin embargo, no se puede argumentar algo concluyente debido a que, por separado, las dosis subtóxicas de las toxinas provocan también un ligero efecto hipocinético. Por otra parte, se observó un aumento significativo de la inmunoreactividad a los cuatro marcadores pro-inflamatorios evaluados (GFAP, TNF α , IL-6 e iNOS), evidencia de procesos de daño neuronal, y, finalmente, una clara disminución de GABA, lo que nos habla de muerte neuronal.

Estos resultados, en su conjunto, no muestran una potenciación o sinergismo completo de los procesos tóxicos evocados por QUIN y 3-NP en dosis subtóxicas, aunque si se observó un evento de facilitación tóxica. Posiblemente observamos que nuestro modelo es de facilitación tóxica y no sinérgico debido a que éste se observa cuando hay una inhibición de SDH de más del 35% (~ 35 mg/Kg/día) (Jacquard *et al.*, 2006), o bien, puede que sea sinérgico para otros marcadores de daño pero no para los evaluados en este trabajo. Sin embargo, este modelo representa una herramienta para el estudio de mecanismos involucrados en diferentes patologías que tienen como factores comunes la excitotoxicidad y el déficit energético.

CONCLUSIONES

El modelo de utilización conjunta de dosis subtóxicas de QUIN y 3-NP empleado en este trabajo puede ser una herramienta funcional para una evaluación más profunda de los diferentes procesos presentes en la degeneración neuronal, teniendo en cuenta que en él se caracterizan dos de los eventos tóxicos más importantes presentes en la degeneración neuronal acontecida en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, la excitotoxicidad y el déficit energético.

La evaluación de marcadores conductuales, pro-inflamatorios y de activación glial, así como bioquímicos, sugieren que la administración de una dosis subtóxica de 3-NP más una dosis subtóxica de QUIN provoca un evento tóxico que conlleva la presencia de patrones hipocinéticos, aumento significativo en la reactividad celular a GFAP, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e iNOS, y disminución en los niveles celulares de GABA. Estos datos no definen un evento sinérgico en el modelo de utilización conjunta de QUIN y 3-NP, pero sí un caso de facilitación tóxica.

PERSPECTIVAS

El modelo experimental de degeneración neuronal evocado por la utilización conjunta de QUIN y 3-P mostró, en este trabajo, representar adecuadamente algunas de las deficiencias motoras, así como ciertas características pro-inflamatorias y neuroquímicas, presentes en enfermedades neurodegenerativas, como lo es la Enfermedad de Huntington. Es por esta razón que resulta ser una herramienta efectiva para el estudio y la comprensión de los procesos fisiopatológicos observados en la degeneración celular.

Siendo un modelo relativamente nuevo, y por esto, poco estudiado, las posibilidades de investigación son muy grandes. Una perspectiva inicial sería la estandarización de las dosis aplicadas y la forma en como son administradas ambas toxinas. En este sentido, sería bueno el caracterizar diferentes niveles de toxicidad (facilitación, sinergismo, potenciación).

Por otro lado, es necesario descartar la participación de sustancias diferentes a QUIN o 3-NP en el proceso neurodegenerativo, es decir, sustancias fuera del sistema nervioso que pudieran ser activadas por QUIN o por 3-NP y que no estén directamente relacionadas a procesos excitotóxicos y/o de déficit energético.

Una vez que el modelo experimental esté caracterizado en su totalidad será indispensable estudiar el efecto de diversas sustancias potencialmente terapéuticas (ej. antioxidantes) sobre los diferentes marcadores de degeneración neuronal.

Adicionalmente, el estudio de las interacciones entre el déficit energético provocado por 3-NP y la excitotoxicidad evocada por QUIN será imperioso para un mejor entendimiento del proceso tóxico.

REFERENCIAS

1. Ahuja, M., Bishnoi, M., Chopra, K. (2008) *Protective effect of minocycline, a semi-synthetic second-generation tetracycline against 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced neurotoxicity*. Toxicology. 244:111-122
2. Alexi, T., Hughes, P.E., Faull, R.L., Williams, C.E. (1998) *3-nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration*. NeuroReport. 9:R57-R64
3. Alston TA, Mela L, Bright HJ. (1977) *3-nitropropionate, the toxic substance of Indigofera, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase*. Proc Natl Acad Sci U S A. 74: 3767-71.
4. Anderson, R.C., Majak, W., Rassmussen, M.A., Callaway, T.R., Beier, R.C., Nisbet, D.J., Allison, M.J. (2005) *Toxicity and Metabolism of the conjugates of 3-nitropropanol and 2-notropropionic acid in forages poisonous to livestock*. J. Agric. Food Chem. 53:2344-2350
5. Aminoff, M.J., Marshall, J., Smith, E.M., et al. (1975). *Pattern of intellectual impairment in Huntington's chorea*. Psychol. Med. 5:169
6. Arundine, M. and Tymianski, M. (2003) *Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity*. Cell Calcium. 34:325-337
7. Bazzett, T.J., Falik, R.C., Becker, J.B., Albin, R.L. (1996) *Synergistic effects of chronic exposure to subtheshold concentrations of quinolinic acid and malonate in the rat striatum*. Brain Research. 718:228-232
8. Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., Martin, J.B., (1986) *Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid*. Nature 321, 168–171.
9. Beal, M.F. (1992) *Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness?* Ann. Neurol. 31:119-130
10. Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Miller, J.M., Storey., Srivastava, R., Rosen, B.R., Hyman, B.T. (1993) *Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions*

- produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. J. Neurosci.* 13:4181-4192
11. Beal, M.F. (1994) *Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease.* Curr Opin Neurol. 7: 542-7.
 12. Binienda, Z., Simmons, C., Hussain, S., Slikker, W. Jr., Ali, S.F. (1998) *Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain.* Neurosci. Lett. 251:173-176
 13. Bondy, S.C. and LeBel, C.P. (1993) *The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system.* Free Radic. Biol. Med. 14:633-642
 14. Bordelon, Y.M., Chesselet, M.F., Nelson, D., Welsh, F., Erecinska, M. (1997) *Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum.* J. Neurochem. 69:1629-1693.
 15. Borlongan C. V., Koutouzis T. K., Randall T. S., Freeman T. B., Cahill D. W. and Sanberg P. R. (1995a) *Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats.* Brain Res. Bull. 36:549-556.
 16. Borlongan C. V., Koutouzis T. K., Freeman T. B., Cahill D. W. and Sanberg P. R. (1995b) *Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease.* Brain Res. 697:254-257
 17. Borlogan, C.V., Koutouzis, T.K., Freeman, T.B., Cahill, D.W., Sanberg, P.R. (1997) *Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease.* Brain. Res. 697:254-257
 18. Borlogan, C.V., Koutouzis, T.K., Freeman, T.B., Hauser, R. A., Cahill, D.W., Sanberg, P.R. (1997) *Hyperactivity and Hipoactivity in a rat model of Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model.* Brain Res. Protocols. 1:253-257
 19. Borlogan, C.V., Nishino, H. and Sanberg, P.R. (1997) *Sistemic, but not intraparenchymal, administration of 3-nitropropionic acid mimics the*

- neuropathology of Huntington's disease: a speculative explanation.* Neuroscience Research. 28:185-189
20. Borlogan, C.V., Nishino, H. and Sanberg, P.R. (1999) *Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders.* Humana Press Inc. pp.
 21. Brandt, J. (1985) *Access to knowledge in the dementia of Huntington's disease.* Dev Neuropsychol 1:335
 22. Brennan, W.A., Bird, E.D., Aprille, J.R. (1985) *Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease.* J. Neurochem. 44:1948-1950
 23. Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F. Hantraye, P. (1999) *Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals.* Prog. Neurobiol. 59:427-468
 24. Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., Blum, D. (2005) *3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease.* Journal of Neurochemistry. 95:1521-1540
 25. Burke J.R., Enghild J.J., Martin M.E., et al. (1996) *Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GADPH.* Nat Med. 2:347-350.
 26. Caine, E.D., Hunt, R.D., Weingartner, H., et al. (1978). *Huntington's dementia: Clinical and neuropsychological features.* Arch. Gen. Psychiatry. 35:377
 27. Choi, D.W. (1988) *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.* 1:623-634
 28. Chu, K.C., Cueto Jr., C., Douglas, J.F., Coodman, D.C., Griesemer, R.A., Milman, H.A., Orme, T.W., Squire, R.A., Ward, J.M. (1978) *Bioassay of 3-nitropropionic acid for possible carcinogenicity.* Carcinogenesis. Technical Report Series. 52:1-126
 29. Coles, C.J., Edmonson, D.E. and Singer, T.P. (1979) *Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate.* J. Biol. Chem. 254:5161-5167.

30. Collin, T., Arvidsson, A., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2005) *Quantitative analysis of generation of different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury*. *Exp. Neurol.* 195:71-80
31. Connick, J.H., Stone, T.W. (1986) *The effects of quinolinic and b-kainic acids on the release of endogenous glutamate from rat brain slices*. *Biochem. Pharmacol.* 35:3631-3635.
32. Connick, J.H., Stone, T.W. (1988) *Quinolinic acid effects on amino acid release from the rat cerebral cortex in vitro and in vivo*. *Brit. J. Pharmacol.* 93:868-876.
33. Coyle JT, Schwarcz R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature.* 263: 244-6.
34. Cummings, J.L. (1990) *Subcortical Dementia*. New York/Oxford, Oxford University Press.
35. Cummings, J.L. (1995) *Behavioral and psychiatric symptoms associated with Huntington's disease*. New York, Raven Press, pp. 179
36. Deshpande, S.B., Fukuda, A., Nishino, H. (1997) *3-Nitropropionic acid increases the intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by reverse operation of the Na^+-Ca^{2+} exchanger*. *Exp. Neurol.* 145:38-45
37. Digledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F. (1999) *The glutamate receptor ion channels*. *Pharmacol. Rev.* 51:7-61
38. Dong, J., Shear, D.A., Gundy, C.D., Creguer-Haik, K., Dunbar, G.L. (1996) *Behavioral and histological comparisons of two animal models of Huntington's disease*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22, 227.
39. Dragatsis, I., Levine, M.S. and Zeitlin, S. (2000) *Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice*. *Nat Genet* 26, 300-306
40. During, M.J., Heyes, M.P., Freese, A., Markey, S.P., Martin, J.B., Roth, R.H (1989) *Quinolinic acid concentrations in striatal extracellular fluid reach potentially neurotoxic levels following systemic L-tryptophan loading*. *Brain Res.* 476:384-387

41. Edmonds, C. (1966). *Huntington's chorea, dysphagia and death*. Med. J. Aust. 2:273
42. El-Defrawy, S.R., Boegman, R.J., Jhamandas, K., Beninger, R.J. (1986) *The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 64:369-375
43. El Massioui N., Ouary S., Cheruel F., Hantraye P. and Brouillet E. (2001) *Perseverative behavior underlying attentional set-shifting deficits in rats chronically treated with the neurotoxin 3-nitropropionic acid*. Exp. Neurol. 172:172–181.
44. Elinos-Calderón, D., Robledo-Arratia, Y., Pérez-De La Cruz, V., Maldonado, P.D., Galván-Arzáte, S., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, A. (2009) *Antioxidant strategy to rescue synaptosomes from oxidative damage and energy failure in neurotoxic models in rats: protective role of S-allylcysteine*. J. Neural Transm.
45. Elinos-Calderón, D. (2009) *Neuroprotección por la L-carnitina y la L-alilcisteina como post-tratamientos en modelos de daño neuronal*. Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
46. Engelsen, B. (1986) *Neurotransmitter glutamate: its clinical importance*. Acta Neurol. Scand. 74:337-355
47. Fernandez-Leite, J. (2001) *La Enfermedad de Huntington: una visión biomoléculat*. Rev. Neurol. 32(8):762-767
48. Folstein SE, Folstein MF, McHugh PR *Psychiatric syndromes in Huntington's disease*. In Chase TN, Wexler NS, Barbeau A (eds): Huntington's Disease. (Advances in Neurology, v 23). New York, Raven Press, 1979, p 281
49. Foster, A.C., Collins, J.F., Schwarcz, R. (1983) *On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidin dicarboxylic acids y structurally related compounds*. Neuropharmacology. 22:1331-1342
50. Galas MC, Bizat N, Cuvelier L, Bantubungi K, Brouillet E, Schiffmann SN, et al. (2004) *Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms*. Neurobiol Dis. 15:152-9.
51. Ganong W. (1982). *Fisiología Médica*. Editorial El Manual Moderno.

52. Gervais, F.G. et al. (2002) *Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1*. *Nat Cell Biol* 4, 95-105
53. González-Cortés, C and Santamaría, A. (2007) *Quinolinic acid, Huntington's disease and inflammatory events in the brain*. *New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies*.
54. González-Cortés, C., Salinas-Lara, C., Gómez-López, M.A., Tena-Suck, M.L., Pérez de la Cruz, V., Rembao-Bojórquez, D., Pedraza-Chaverrí, J., Gómez-Ruiz, C., Galván-Arzate, S., Ali, S.F., Santamaría, A. (2008) *Iron porphyrinate Fe(TPPS) reduces brain cell damage in rats intrastrially lesioned by quinolinate*. *Neurotoxicology and Teratology*. 30:510-519
55. Gould, D.H. and Gustine, D.L. (1982) *Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropionic acid*. *Neurophatol. Appl. Neurobiol.* 8:377-393
56. Gramsbergen, J.B., Hodgkins, P.S., Rassoulpour, A., Turski, W.A., Guidetti, P., Schwarcz, R. (1997) *Neurochem.* 69:290
57. Greene, J.G., and Greenamyre, J.T. (1995) *Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-Glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate*. *J. Neurochem.* 64:2332-2338
58. Greene, J.G., and Greenamyre, J.T. (1996) *Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo*. *J. Neurochem.* 66:637-643
59. Greene, J.G., Sheu, S.S., Gross, R.A., Greenamyre, J.T. (1998) *3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms*. *Neuroscience.* 84:503-510
60. Greenamyre, J.T., Porter, R.H. (1994) *Anatomy and physiology of glutamate in the CNS*. *Neurology.* 44:S7-13
61. Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. (1996) *Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus*. *Ann Neurol.* 39: 385-9.

62. Guidetti, P., Bates, G.P., Graham, R.K., Hayden, M.R., Leavitt, B.R., MacDonald, M.E., Slow, E.J., Wheeler, V.C., Woodman, B., Schwarcz, R. (2004) *Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington's disease mice*. Neurobiol. Dis. 23 :190-197
63. Guyot, M.C., Hantraye, P., Dolan, R., Palfi, S., Maziere, M., Brouillet, E. (1997) *Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid*. Neuroscience. 79:45-56
64. Haddad, M.S. and Cummings, J.L. (1997) *Huntington's disease*. The Psychiatric Clinics of North America. 20:791-807
65. Hamilton, B.F. and Gould, D.H. (1987a) *Correlation of morphologic brain lesions with physiologic alterations and blood-brain barrier impairment in 3-nitropropionic acid toxicity in rats*. Acta Neuropathol. (Berl.) 72:286-297
66. Hayden, M.R. (1981). *Huntington's chorea*. Berlin/Heidelberg/New York, Springer-Verlag.
67. He, F., Zhang, S., Qian, F. and Zhang, C. (1995) *Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid)*. Neurology. 45:2178-2183
68. Hebb, C. (1970) *CNS at the cellular level: identity of transmitter agents*. Annu. Rev. Physiol. 32:165-192
69. Herrera-Mundo, M.N., Silva-Adaya, D., Maldonado, P.D., Galvan-Arzate, S., Andres-Martínez, L., Pérez-de la Cruz, V., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, A. (2006) *S-allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction*. Neuroscience Res. 56:39-44
70. Heathfield, K. W. G. (1973) *Huntington's Disease: a centenary review*. Postgraduate Medical Journal. 49:32-45
71. Huang, L-S., Sun, G., Cobessi, D., Wang, A.C., Shen, J.T., Tung, E.Y., Anderson, V.E., Berry, E.A. (2006) *3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a*

- covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme.* The Journal of Biological Chemistry. 281:5965-5972
72. Jacquard, C., Trioulier, Y., Cosker, F., Escartin, C., Bizat, N., Hantraye, P., Cancela, J.M., Bonvento, G., Brouillet, E. (2006) *Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation.* The FASEB Journal. 20:1021-1023
 73. Kandel RE, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. *Principios de Neurociencia.* Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España.
 74. Kerr, S.J., Armati, P.J., Brew, B.J. (1995) *Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain cultures.* J. Neurovirol. 1:375-380.
 75. Kerr, S.J., Armati, P.J., Guillemin, G.J., Brew, B.J. (1998) *Chronic exposure of human neurones to quinolinic acid results in neuronal changes consistent with AIDS dementia complex.* AIDS. 12:355-363.
 76. Kim, J.P., Choi, D.W. (1987). *Quinolinic acid neurotoxicity in cortical cell culture.* Neuroscience 23:423-432.
 77. Koutouzis, T.K., Borlogan, C.V., Freeman, T.B., Cahill, D.W., Sanber, P.R. (1994a) *Intrastratial 3-nitropropionic acid: a behavioral assessment.* Neuroreport. 5:2241-2245
 78. Koutouzis, T.K., Borlogan, C.V., Scorcia, T., Creese, I., Cahill, D.W., Freeman, T.B., Sanberg, P.R. (1994b) *Systemic 3-nitropropionic acid: long-term effects on locomotor behaviour.* Brain Res. 646:242-246
 79. La Fontaine, M., Geddes, J.W., Banks, A., Butterfield, D.A. (2000) *3-nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease.* Brain Res. 858:356-362
 80. Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., Bockaert, J. (1993) *NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity.* Nature. 364:535-537
 81. Lees, G.J. (1993) *Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders.* Neuroscience. 54:287-322
 82. López-González, A.S., García-Girón, C., Cavia-Sáiz, M., López-Muñoz, A., García-González, M., del Corral, M.J., Muñoz-Rodríguez, P. (2007)

Inmunotolerancia en tumores gastrointestinales: HLA-G e Indolamina 2,3-dioxigenasa. Electron J. Biomed. 3:59-65

83. Li X-J., Charp A.H., Nucifora F.C. (1995). *A huntingtin associated protein enriched in brain with implications for pathology.* Nature. 378:398-402.
84. Li, Shi-Hua.; Li, Xiao-Jiang. (2004) *Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease.* Trends in Genetics. 20:146-154
85. Liu, Y-F., Dorowll, D. and Marshall, J. (2000). *Activation of MLK2-mediated Signaling Cascades by Polyglutamine-expanded Huntingtin.* The Journal of Biological Chemistry. 275:19035-19040
86. Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., Bossy-Wetzler, E. (2009) *Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA-and ROS-dependent pathway.* Cell Death Differ. 16:899-909
87. Ludolph, A.C., He, F., Spencer, P.S., Hammerstad, J., Sabri, M. (1991) *3-Nitropropionic acid –exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin.* Can. J. Neurol. Sci. 18:492-498
88. Lunkes, A., Linderberg, K.S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.L., Trottier, Y. (2002). *Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmatic and nuclear inclusions.* Mol. Cell 10. 259-69.
89. Martin, R.L., Lloyd, H.E., Cowan, A.I. (1994) *The early events of oxygen and glucose deprivation: Setting the scene for neuronal death?* Trends Neurosci. 17:251.257
90. Morris, M. (1995). *Dementia and cognitive changes in Huntington's disease.* New York, Raven Press, pp. 187.
91. Nakai, M., Qin, Z.H., Wang, Y., Chase, T.N. (1999) *Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NFkB activation and apoptosis in rat striatum.* Molec. Brain Res. 64:59-68.
92. Nakao, N., Brundin, P. (1997) *Effects of a-phenyl-t-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinate or 3-nitropropionic acid.* Neuroscience 76:749-761.

93. Nam, E., Lee, S.M., Koh, S.E., Joo, W.S., Maeng, S., Im, H.I., Kim, Y.S. (2005) *Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum*. Brain Res. 1046:90-96
94. Nasr, P., Carbery, T., Geddes, J.W. (2009) *N-methyl-D-aspartate receptor antagonist have variable affect in 3-nitropropionic acid toxicity*. Neurochem. Res. 34:490-8
95. Nishino H, Hida H, Kumazaki M, Shimano Y, Nakajima K, Shimizu H, et al. (2000) *The striatum is the most vulnerable region in the brain to mitochondrial energy compromise a hypothesis to explain its specific vulnerability*. J Neurotrauma. 17: 251-60.
96. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. Brain Res. 451: 205-12.
97. Okamoto, H., Yamamoto, S., Nozaki, M., Hayaishi, O. (1967) Biophys. Res. Commun. 26:309
98. Okuno, E., Kohler, C., Schwarcz, R. (1987) Neurochem. 49:771
99. Olney, J.W., O.L. Ho, et al. (1971) *Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system*. Exp. Brain Res. 14:61-76
100. Olney, J.W. (1990) *Excitotoxicity: an overview*. Can. Dis. Wkly Rep. 16 Suppl. 1E, 47-57; discussion 57-48
101. Ouary, S., Bizat, N., Altairac, S., Mnetrat, H., Mittoux, V., Conde, F., et al. (2000) *Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: implications for neuroprotection studies*. Neuroscience. 97:521-30
102. Pang, Z., Geddes, J.W. (1997) *Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis*. J. Neurosci. 17:3064-73
103. Paulson G.W. (1979). *Diagnosis of Huntington's disease*. Advances in Neurology, vol 23.

104. Pérez-De La Cruz V., González-Cortés C., Galván-Arzate S., Medina-Campos O. N., Pérez-Severiano F., Ali S. F., Pedraza-Chaverri J. and Santamaría A. (2005) *Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III)*. Neuroscience 135:463-474.
105. Pérez-De La Cruz, V., González-Cortés, C., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Andrés-Martínez, L., Santamaría, A. (2006) *Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes*. Brain Res. Bull. 68:379-383
106. Pérez-De La Cruz, V., Königsberg, M. and Santamaría, A. (2007) *Kynurenine Pathway and Disease: An Overview*. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets. 6:398-410
107. Pérez-De La Cruz, V.; Santamaría, A. (2007) *Integrative Hypothesis for Huntington's Disease: A Brief Review of Experimental Evidence*. Physiol. Res. 56:513-526
108. Pérez-De La Cruz, V., Elinos, C.D., Robledo, Y., Medina Campos, O., Pedraza Chaverri, J., Ali, S.F., Santamaría, A. (2009) *Targeting oxidative/nitrogenic stress ameliorates motor impairment, and attenuates synaptic mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in two models of Huntington's disease*. Behavioural Brain Research. 199:210-217
109. Pérez-De La Cruz, V., Königsberg, M., Pedraza-Chaverri, J., Herrera-Mundo, N., Díaz-Muñoz, M., Morán, J., Fortoul-van der Goes, T., Rondán-Zárate, A., Maldonado, P.D., Ali, S.F., Santamaría, A. (2008) *Citoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic/energetic deficit synergic model in rats*. European Journal of Neurosciences. 27:1075-1085
110. Perutz, M. (1999). Trends Biochem. Sci. 24:58-63.
111. Potegal, M. (1971) *A note on spatial motor deficits in patients with Huntington's disease: A test of a hypothesis*. Neuropsychology. 9:233

112. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia A, McNamara LO, Williams SM. 2006. *Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana S.A.
113. Rami, A., Ferger, D., Krieglstein, J. (1997) *Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity*. *Neurosci. Res.* 27:93-97
114. Ríos, R.C. and Santamaría, A. (1991) *Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates*. *Neurochem. Res.* 16:1139-1143.
115. Roberts, R.C.; Du, F.; McCarthy, K.E.; Okuno, E.; Schwarcz, R. *J.* (1992) *Comp. Neurol.*, 326, 82.
116. Roberts, R.C.; McCarthy, K.E.; Du, F.; Ottersen, O.P.; Okuno, E.; Schwarcz, R. *J.*(1995) *Neurosci.*, 15, 1150.
117. Roitberg, B.Z., Emborg, M.E., Sramek, J.G., Palfi, S., Kordower, J.H. (2002) *Behavioral and morphological comparison of two nonhuman primate models of Huntington's disease*. *Neurosurgery.* 51:852-853
118. Rubinsztein, D.C.; Carmichael, J. (2003) *Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration*. *Expert Review in Molecular Medicine.* 5:1-22
119. Ryu JK, Nagai A, Kim J, Lee MC, McLarnon JG, Kim SU. (2003) *Microglial activation and cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in vitro and in vivo studies*. *Neurol Dis.* 12: 121-32
120. Ryu, H., Rosas, H.D., Hersch, S.M., Ferrante, R.J. (2005) *The therapeutic role of creatine in Huntington's disease*. *Pharmacol. Ther.* 108:193-207
121. Saito, K., Nowak, T.S. Jr., Markey, S.P., Heyes, M.P. (1992) *Neurochem.* 60:180
122. Saito, K., Elce, J.S., Hamos, J.E., Nixon, R.A. (1993) *Widespread activation of calcium-activated neutral protease (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2628-2632
123. Sanberg, P.R., Calderon, S.F., Giordano, M., Tew, J.M., Norman, A.B. (1989) *The quinolinic acid model of Huntington's disease: Locomotor abnormalities*. *Exp. Neurology.* 105:45-53

124. Santamaría, A. and 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
125. Schiefer, J., Töpfer, R., Schmidt, W., Block, F., Heinrich, P.C., Noth, J., Schwarz, M. (1998) *Expression of interleukin 6 in the rat striatum following stereotaxic injection of quinolinic acid*. *J. Neuroimmunology.* 89:168-176
126. Schulz, J.B., Henshaw, D.R. (1996) *Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity*. *Neurochem. Int.* 29:167-171
127. Schwarcz, R., Whetsell, W.O., Jr, Mangano, R.M., (1983) *Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain*. *Science* 219, 316–318.
128. Shear D.A., Dong, J., Gundi, C.D., Haik-Creguer, K.L., Dunbar, G.L. (1988) *Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease*. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 22:1217-1240
129. Shoulson, I. (1984). *Huntington's disease: a decade of progress*. *Neurol Clin.* 2:515-526.
130. Siesjo, B.K. (1981) *Cell damage in the brain: a speculative synthesis*. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* 1:155-185
131. Silva-Adaya, D., Pérez-De La Cruz, V., Herrera-Mundo, M.N., Mendoza-Macedo, K., Villeda-Hernandez, J., Binienda, Z., Ali, S.F., Santamaría, A. (2008) *Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine*. *J. Neurochem.* 105:677-689
132. Stone, T.W., Perkins, M.N. (1981) *Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS*. *Eur. J. Pharmacol.* 72:411-412
133. Stone, T.W., Connick, J.H., Winn, P., Hastings, M.H., English, M., (1987) *Endogenous excitotoxic agents*. In: *Selective Neuronal Death Ciba Foundation Symp.*, 126. Wiley, Chichester, pp. 204-220.
134. Stone, T.W. (Ed.), (1989) *Quinolinic Acid and the Kynurenines*. CRC Press, Boca Raton, FL.

135. Stone, T.W. (1993) *Pharmacol. Rev.* 45:309
136. Stone, T.W. (2001) *Endogenous neurotoxins from tryptophan.* *Toxicol.* 39:61-73
137. Tabrizzi SJ, Cleeter MW, Xucreb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. (1999) Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol.* 45: 25-32.
138. Tattersfield, A.S., Croon, R.J., Liu, Y.W., Kells, A.P., Faull, R.L.M., Connor, B. (2004) *Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid model of Huntington's disease.* *Neuroscience.* 127:319-332
139. Túnez, I., Montilla, P., Del Carmen-Muñoz, M., Feijo, M., Salcedo, M. (2004) *Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease.* *J. Pineal Res.* 37:252-256
140. Túnez, I., Muñoz, M.C., Montilla, P. (2005) *Treatment with dehydroepiandrosterone prevents oxidative stress induced by 3-nitropropionic acid in synaptosomes.* *Pharmacology.* 74:113-118
141. Túnez, I. and Santamaría, A. (2009) *Modelo de enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico.* *Rev. Neurol.* 48(8):430-434
142. Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De La Cruz, V., Santamaría, A. (2010) *3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: Past, Present and Future.* *Molecules.* 15:878-916
143. Vender, A.D. (1975) In *Amino Acid Metabolism*; John Wiley and Sons: USA, 172-177
144. Villarán, R.F., Tomás-Camardiel, M., de Pablos, R.M., Santiago, M., Herrera, A.J., Navarro, A., Machado, A., Cano, J. (2008) *Endogenous dopamine enhances the neurotoxicity of 3-nitropropionic acid in the striatum through the increase of mitochondrial respiratory inhibition and free radicals production.* *Neurotoxicology.* 29:244-258
145. Wallesch, C.W., Fehrenbach, R.A. (1988) *On the neurolinguistic nature of language abnormalities in Huntington's disease.* *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 51:367

146. Walling, H. W.; Baldassare, J.; Westfall, T. (1998) *Molecular Aspects of Huntington's Disease*. Journal of Neuroscience Research. 54:301-308
147. Wexler, A. (2006) *Huntington's Disease*. Journal of the Royal Society of Medicine. 99: 53
148. Whetsell Jr., W.O., Schwarcz, R. (1989) *Prolongated exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system*. Neurosci. Lett. 97:271-275.
149. Wolfensberg, M., Amsler, U., Cuenod, M., Foster, A.C., Whetsell, W.O. Jr., Schwarcz, R. (1983) *Neurosci. Lett.* 41:247
150. Wullner, U., Young, A.B., Penney, J.B., Beal, M.F. (1994) *3-nitropropionic acid toxicity in the striatum*. J. Neurochem. 63:1772-1781
151. Yébenes, J. G.; Hernández, J.; Cantarero, S. *Progresos en la Enfermedad de Huntington*. Enfermedades Neurodegenerativas.
152. Zeevalk, G. D. and Nicklas, W. J. (1990) *Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 253:1285–1292.
153. Zeevalk, G. D. and Nicklas, W. J. (1992) *Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism*. J. Neurochem. 59:1211–1220.

ANEXO A

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Estructura

En el sistema nervioso central (SNC) existen dos clases de células, las células nerviosas (neuronas) y células gliales (glía). La neurona tiene cuatro regiones definidas morfológicamente: el cuerpo celular, las dendritas, el axón y las terminales presinápticas. El cuerpo celular (soma) es el centro metabólico de la célula. Contiene el núcleo, que almacena los genes de la célula, así como el retículo endoplásmico rugoso, una extensión del núcleo donde se sintetizan las proteínas de la célula. El cuerpo celular habitualmente es el origen de dos clases de prolongaciones, varias dendritas cortas y un único axón largo y tubular. Las dendritas se ramifican como un árbol y son el aparato principal de recepción de señales procedentes de otras neuronas. Por el contrario, el axón sale del cuerpo celular y es la principal unidad de conducción de señales a otras neuronas. Estas señales eléctricas, denominadas potenciales de acción, son impulsos nerviosos rápidos, fugaces, todo o nada, con una amplitud de 100mV y una duración aproximada de 1 ms. Cerca de su terminación, el axón tubular se divide en finas ramas que forman los lugares de comunicación con otras neuronas. El punto en el que se comunican dos neuronas se conoce como sinapsis. La neurona que transmite la señal se denomina célula presináptica, la que recibe la señal se denomina célula postsináptica. La neurona presináptica transmite señales de las ramas engrosadas de su axón, conocidas como terminales presinápticas. Sin embargo, una célula presináptica no tiene contacto real o anatómico con la neurona postsináptica.

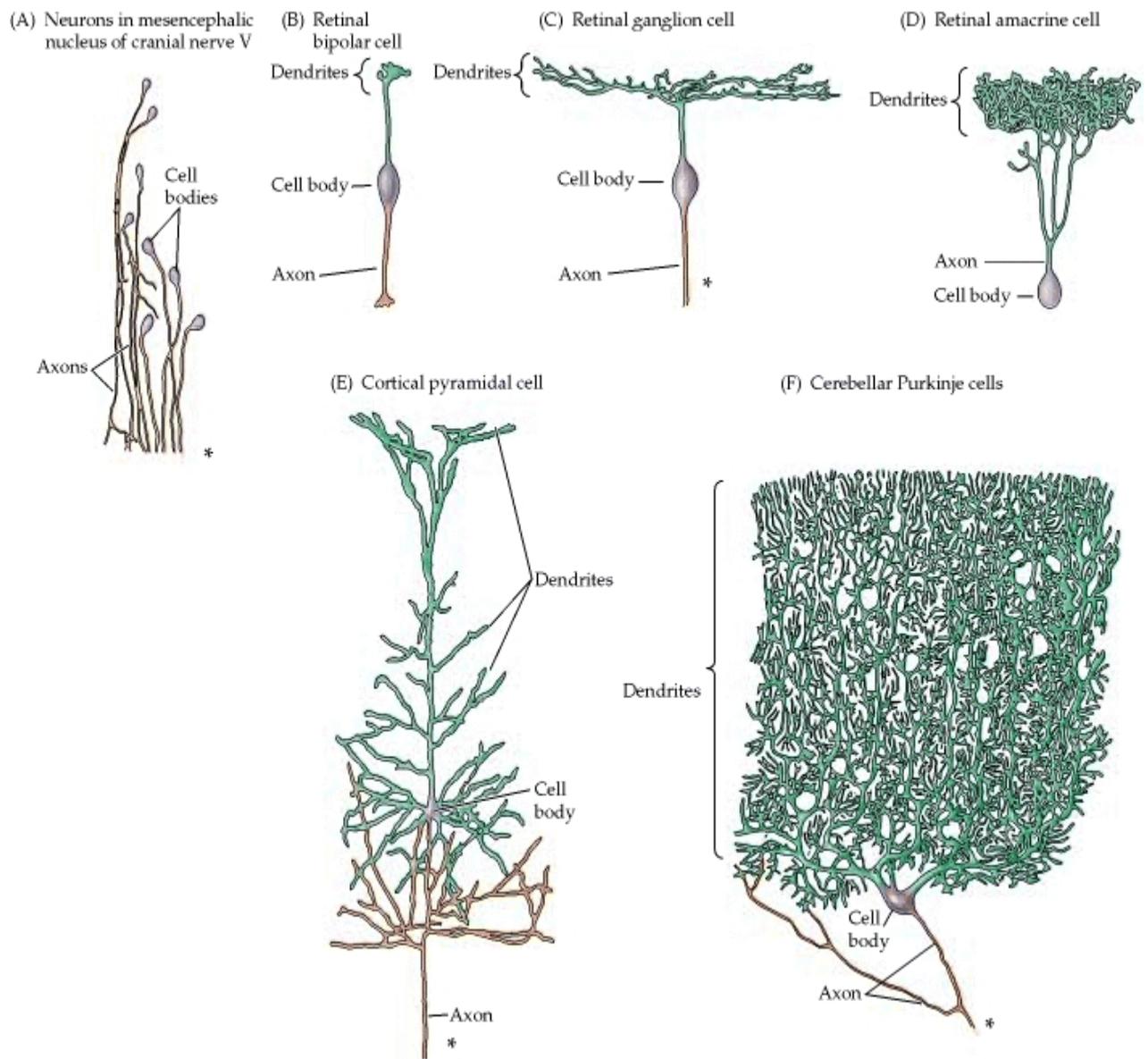


Fig. 15 Ejemplos de la amplia variedad de formas en las células nerviosas encontradas en sistema nervioso humano. (Tomada de *Neuroscience*, Sinauer Associates, Inc. 2001)

Las células gliales superan con mucho en número a las neuronas, hay entre 10 y 50 veces más células gliales que neuronas en el SNC de los vertebrados. Las células gliales rodean los cuerpos celulares, los axones y las dendritas de las neuronas. Hasta el momento se sabe que la glía no participa directamente en la elaboración de la información, pero se piensa que desempeña funciones como dar

estructura al encéfalo sosteniendo las neuronas, produciendo mielina empleada para aislar los axones, que son las prolongaciones celulares de las neuronas que conducen señales eléctricas, fagocitando detritos tras lesiones impidiendo la muerte neuronal, captando transmisores químicos, dando dirección a las neuronas que migran durante el desarrollo cerebral y a los axones en crecimiento, regulando de las propiedades de la terminal presináptica en vertebrados, ayudando en la formación de un revestimiento impermeable en los capilares y vénulas del encéfalo (barrera hematoencefálica) y, posiblemente, liberando factores de crecimiento y ayudando de otras formas a nutrir las neuronas.

Las células gliales del sistema nervioso de los vertebrados se dividen en dos tipos principales, la microglia y la macroglia. La microglia está constituida por fagocitos que se movilizan después de una lesión, una infección o una enfermedad. Surgen de los macrófagos del exterior del sistema nervioso y tanto fisiológica como embriológicamente carecen de parentesco con los restantes tipos celulares del sistema nervioso. Estas células se activan y son reclutadas durante una infección, los traumatismos y las crisis epilépticas. La célula activada tiene un apéndice más robusto y ramificado que las células inactivas, y expresa una gama de antígenos, lo que sugiere que puede actuar como la principal célula presentadora de antígenos en el SNC. En el sistema nervioso de los vertebrados predominan tres tipos de células de macroglía, los oligodendrocitos, las células de Schwann y los astrocitos. Los oligodendrocitos, presentes únicamente en el SNC, y las células de Schwann, presentes solo en el sistema nervioso periférico (SNP), son células pequeñas provistas de un número relativamente escaso de apéndices. Ambos tipos desempeñan la tarea de aislar los axones, formando una vaina de mielina tras enrollar alrededor del axón una apretada espiral con sus prolongaciones membranosas. Los astrocitos son las células gliales más numerosas y deben su nombre a sus cuerpos celulares irregulares, más o menos en forma de estrella. Tienden a tener apéndices muy largos, algunos de los cuales finalizan en pies terminales. Algunos pies terminales situados en la superficie de las neuronas del encéfalo y la medula espinal pueden desempeñar un papel importante a la hora de aportar nutrientes a estas células. Otros astrocitos sitúan

sus pies terminales sobre los vasos sanguíneos del encéfalo y hacen que las células endoteliales del vaso formen las zonas ocluyentes, creando así la barrera hematoencefálica protectora. Los astrocitos también ayudan a mantener la concentración correcta de iones de potasio en el espacio extracelular entre las neuronas (Kandel *et al.*, 2000).

Estructuralmente el SNC consta de la médula espinal y el encéfalo. El encéfalo está compuesto de seis regiones, cada una de las cuales se puede subdividir en varias áreas diferenciadas desde el punto de vista anatómico y funcional. Las seis partes principales del encéfalo son el bulbo, la protuberancia, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencéfalo y los hemisferios cerebrales o telencéfalo. Cada una de estas divisiones se encuentra en los dos hemisferios del encéfalo, pero pueden diferir en su tamaño y su forma.

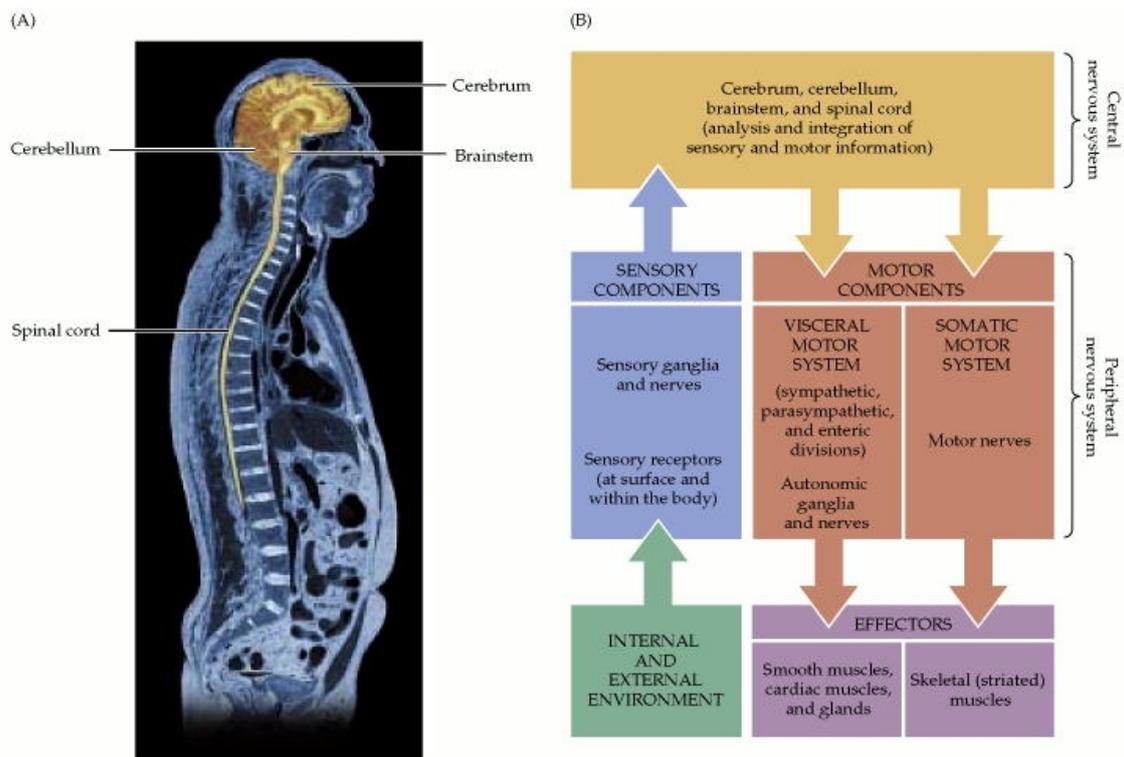


Fig. 16 Componentes principales del sistema nervioso y sus relaciones funcionales (Tomada de *Neuroscience*, Sinauer Associates, Inc. 2001).

La médula espinal es la parte más inferior del sistema nervioso central. Se extiende desde la base del cráneo hasta la primera vértebra lumbar. La medula espinal recibe información sensitiva de la piel, las articulaciones y los músculos del tronco y las extremidades, además contiene a las neuronas motoras responsables tanto de los movimientos voluntarios como los reflejos.

La medula se divide en sustancia gris, que contiene los cuerpos neuronales, y a su vez se divide normalmente en astas anteriores y posteriores. El asta posterior contiene una disposición ordenada de neuronas sensitivas de relevo que reciben información de la periferia, mientras que el asta anterior contiene los núcleos motores que inervan los músculos específicos. La sustancia blanca está constituida por las vías longitudinales de axones mielínicos que forman las vías ascendentes a través de las cuales la información sensitiva llega al encéfalo, y las vías descendentes portadoras de las órdenes motoras y las influencias reguladoras procedentes del mismo.

Las tres divisiones siguientes del sistema nervioso central, por encima de la médula espinal (el bulbo raquídeo, la protuberancia y el mesencéfalo), se denominan en su conjunto tronco encefálico. El tronco encefálico se continúa con la medula espinal y contiene grupos diferenciados de células nerviosas que contribuyen a diversos sistemas sensitivos y motores. La médula espinal es la mediadora de la sensibilidad y el control motor del tronco y las extremidades, mientras que el tronco encefálico se ocupa de la sensibilidad y el control motor de la cabeza, el cuello y la cara.

El bulbo raquídeo es la extensión dorsal directa de la medula espinal y se parece a ella tanto en su organización como en la función. En el bulbo raquídeo hay grupos neuronales que participan en la regulación de la presión arterial y la respiración. El bulbo contiene también grupos neuronales que forman parte de los primeros relevos que participan en el gusto, el oído y el mantenimiento del equilibrio, así como el control de los músculos del cuello y cara.

La protuberancia está situada rostralmente al bulbo raquídeo y forma una prominencia en la superficie ventral del tronco encefálico. La porción ventral de la protuberancia contiene un gran número de grupos neuronales, los núcleos protuberanciales, en los que hace relevo la información sobre el movimiento y la sensibilidad transmitida desde la corteza cerebral al cerebelo. La porción dorsal de la protuberancia contiene estructuras que participan en la respiración, el gusto y el sueño.

El mesencéfalo, la parte más pequeña del tronco encefálico, está en posición rostral a la protuberancia. Las neuronas del mesencéfalo establecen vínculos importantes entre los componentes de los sistemas motores, en especial el cerebelo, los ganglios basales y los hemisferios cerebrales. Por ejemplo, la sustancia negra, un núcleo diferenciado del mesencéfalo, proporciona aferencias importantes a la porción de los ganglios basales que regula los movimientos voluntarios. El mesencéfalo contiene también componentes de los sistemas auditivo y visual. Finalmente varias regiones del mesencéfalo están conectadas con los músculos oculares extrínsecos y con la vía principal de control de los movimientos oculares.

El cerebelo, situado sobre la protuberancia, contiene un número mayor de neuronas que cualquier otra subdivisión del encéfalo, incluidos los hemisferios cerebrales. Sin embargo, sus tipos celulares son relativamente escasos, lo que hace que sus circuitos sean bien conocidos. La superficie, o corteza cerebelosa, está dividida en varios lóbulos separados por hendiduras netamente visibles. El cerebelo recibe aferencias somatosensoriales de la médula espinal, información motora de la corteza cerebral, y aferencias sobre el equilibrio procedente de los órganos vestibulares del oído interno. Es importante para mantener la postura y para coordinar los movimientos de la cabeza y ojos, y participa también en el ajuste fino de los movimientos musculares y el aprendizaje de las habilidades motoras. Estudios recientes han revelado que el cerebelo también participa en el lenguaje y otras funciones cognitivas. En la base de estas funciones se

encuentra una muy importante entrada de información de las regiones de asociación sensitiva de la neocorteza a los núcleos protuberanciales.

El diencefalo contiene dos subdivisiones importantes: el tálamo y el hipotálamo. El tálamo es un eslabón esencial en la transferencia de la información sensitiva (diferente de la olfatoria) desde los receptores periféricos a las regiones de procesamiento sensitivo de los hemisferios cerebrales. El tálamo determina si la información sensitiva alcanza la consciencia de la neocorteza. También participa en la integración de la información motora del cerebelo y los ganglios basales y transmite esta información a las regiones de los hemisferios cerebrales que se ocupan del movimiento. El diencefalo tiene también regiones a las que se atribuye, como la formación reticular, influencia en los niveles de atención y consciencia. El hipotálamo está en situación ventral al tálamo y regula varias conductas esenciales para la homeostasis y la reproducción. Controla diversas funciones corporales como el crecimiento, el comer, el beber y la conducta maternal, regulando las secreciones de la hipófisis. El hipotálamo influye también en la conducta por su amplia red de conexiones aferentes y eferentes con prácticamente la totalidad del SNC. Una parte del hipotálamo, el núcleo supraquiasmático, regula los ritmos circadianos, conductas cíclicas arrastradas por el ciclo luz-oscuridad diario.

Los hemisferios cerebrales forman la región más grande del encéfalo humano. Consisten en la corteza cerebral, la sustancia blanca subyacente, y tres estructuras profundas: los ganglios basales, el núcleo amigdalino y la formación del hipocampo. Los hemisferios cerebrales se ocupan de funciones perceptivas, motoras y cognitivas, incluidas la memoria y la emoción. Los dos hemisferios están conectados entre sí por el cuerpo caloso, un conjunto llamativo de fibras que conectan regiones simétricas en ambos hemisferios. El cuerpo caloso, visible en la cara medial de los hemisferios, es la mayor de las comisuras, estructuras que contienen fibras que unen fundamentalmente regiones similares del lado izquierdo y derecho del encéfalo. El núcleo amigdalino está relacionado con la

conducta social y la expresión de las emociones, el hipocampo con la memoria y los ganglios basales con el control de los movimientos finos. (Kandel *et al.*, 2000).

Funciones

El sistema nervioso es una estructura bilateral y esencialmente simétrica con siete partes fundamentales: médula espinal, bulbo raquídeo, protuberancia, cerebelo, mesencéfalo, diencefalo y los hemisferios cerebrales. Las diferentes regiones del cerebro están especializadas en diferentes funciones, lo cual es uno de los fundamentos de la ciencia moderna del cerebro.

Todas las funciones conductuales del cerebro – el procesamiento de la información sensitiva, la programación de las repuestas motoras y emocionales, la actividad vital de almacenar información (memoria) - son desempeñadas por conjuntos específicos de neuronas conectadas entre sí. Muchas funciones sensitivas, motoras y cognitivas son realizadas por más de una vía nerviosa. Cuando una región funcional o vía esta lesionada, otras pueden compensar parcialmente la pérdida (Kandel *et al.*, 2000).

Los circuitos o vías que procesan tipos similares de información comprenden sistemas neurales. La distinción funcional más general divide estas selecciones en sistemas sensitivos, que adquieren y procesan información del entorno, y sistemas motores, que responden a esta información generando movimientos y otras conductas. Sin embargo, hay gran cantidad de células y circuitos que se ubican entre estos sistemas aferente y eferente relativamente bien definidos. Estos se denominan en conjunto sistemas de asociación y median las funciones encefálicas más complejas y menos caracterizadas (Purves *et al.*, 2006).

Sistemas Sensitivos

La sensibilidad implica la capacidad para traducir, codificar y finalmente percibir información generada por los estímulos que se originan en el medio ambiente externo e interno. Gran parte del cerebro se dedica a estos aspectos. Aunque los

sentidos básicos (la sensibilidad somática, la visión, la audición, la sensación vestibular y los sentidos químicos) son muy diferentes entre sí, algunas reglas fundamentales gobiernan la forma en que el sistema nervioso se ocupa de cada una de estas modalidades. Los receptores convierten la energía asociada con las fuerzas mecánicas, la luz, las ondas sonoras, las moléculas con olor o las sustancias químicas ingeridas en señales nerviosas –señales sensitivas aferentes– que transmiten información acerca del estímulo al encéfalo. Estas señales sensitivas aferentes activan las neuronas centrales capaces de representar tanto la naturaleza cualitativa como la cuantitativa del estímulo y, en algunas modalidades, la localización del estímulo en el espacio.

El sistema somatosensorial tiene dos componentes principales: un subsistema para la detección de estímulos mecánicos (p. ej., tacto leve, vibración, presión y tensión cutánea) y un subsistema para la detección de los estímulos dolorosos y la temperatura. En conjunto, estos dos subsistemas brindan a los seres humanos y otros animales la capacidad para identificar las formas y las texturas de los objetos, controlar las fuerzas internas y externas que actúan sobre el organismo en cualquier momento, y detectar situaciones que pueden ser nocivas. El procesamiento mecanosensitivo de los estímulos externos se inicia por la activación de una población diversa de mecanoreceptores cutáneos y subcutáneos en la superficie corporal que transmiten información hasta el SNC para su interpretación, y finalmente para la acción. Receptores adicionales localizados en los músculos, las articulaciones y otras estructuras profundas controlan las fuerzas mecánicas generadas por el sistema musculoesquelético y se denominan propioceptores. La información mecanosensitiva es transmitida al encéfalo por varias vías ascendentes que se encuentran paralelas a través de la medula espinal, el tronco encefálico y el tálamo, para alcanzar la corteza somatosensitiva primaria en la circunvolución poscentral del lóbulo parietal. La corteza somatosensitiva primaria se proyecta a su vez a las cortezas de asociación de orden superior en el lóbulo parietal, y de nuevo a las estructuras subcorticales involucradas en el procesamiento de la información somatosensitiva. Con respecto al dolor, son los nociceptores los responsables del inicio de la

sensación dolorosa. Al igual que otros receptores cutáneos y subcutáneos, traducen distintos estímulos en potenciales del receptor, que a su vez desencadenan potenciales de acción aferentes.

La visión es un sentido que consiste en la habilidad de detectar la luz y de interpretarla. El sentido de la vista permite que el cerebro perciba las formas, los colores y el movimiento; este es el modo en el que vemos el mundo (Purves *et al.*, 2006). Los ojos convierten la energía del espectro visible en potenciales de acción en el nervio óptico. Las imágenes de los objetos existentes en el medio son enfocadas sobre la retina y los rayos luminosos que inciden sobre ella producen los potenciales generadores en los conos y los bastones. Los impulsos que se inician en la retina son conducidos a la corteza cerebral donde producen la sensación visual (Ganong, 1982).

Los receptores de dos modalidades sensoriales, los de la audición y los del equilibrio, se encuentran alojados en el oído. El oído externo, el oído medio y la cóclea del oído interno están relacionados con la audición (sistema auditivo); en cambio, los canales semicirculares, el utrículo y probablemente el sáculo del oído interno, se encuentran relacionados con el equilibrio (sistema vestibular). En el sistema auditivo, el oído externo canaliza la energía acústica, el oído mediotransforma la energía acústica en energía mecánica, transmitiéndola y amplificándola hasta el oído interno y el oído interno realiza la transformación definitiva de la energía mecánica en impulsos eléctricos. En el sistema vestibular el utrículo y el sáculo informan de la posición de la cabeza en relación con el suelo. Sobre los cilios de sus células sensoriales se hallan unos pequeños cristales de carbonato cálcico llamados otolitos. Sus células sensoriales generan impulsos que llegan hasta el cerebelo, lo que nos permite mantener el equilibrio a pesar de que realicemos desplazamientos, giros o aceleraciones. (Ganong, 1982).

La detección de las sustancias químicas en el medio ambiente depende de tres sistemas sensitivos: el olfato, el gusto y el sistema quimiosensitivo trigeminal o general. El sistema olfatorio percibe las moléculas transmitidas por aire denominadas sustancias odoríferas. El sistema gustativo detecta principalmente

las moléculas hidrosolubles ingeridas denominadas sustancias gustativas. Por último, el sistema quimiosensitivo trigeminal proporciona información respecto de las moléculas irritantes o nocivas que entran en contacto con la piel o las membranas mucosas de los ojos, la nariz y la boca. Estos tres sistemas quimiosensitivos se basan en receptores en la cavidad nasal, la boca o el rostro que interactúan con las moléculas relevantes y generan potenciales de acción, para transmitir información acerca de los estímulos a las regiones apropiadas del sistema nervioso central (Purves *et al.*, 2006).

Sistemas Motores

Los movimientos, sean voluntarios o involuntarios, son producidos por patrones espaciales y temporales de contracciones musculares orquestadas por el encéfalo y la médula espinal. El circuito del tronco del encéfalo y la médula espinal hacen posible los movimientos reflejos elementales, así como los circuitos que organizan los patrones intrincados de actividad neural responsables de actos motores más complejos. Todos los movimientos producidos por la musculatura esquelética son iniciados por neuronas motoras “inferiores” en la médula espinal y el tronco del encéfalo que inervan directamente los músculos esqueléticos; la inervación de los músculos lisos viscerales está organizada en forma separada por las divisiones autónomas del sistema nervioso visceral. Las neuronas motoras inferiores están controladas de manera directa por circuitos locales en el interior de la médula espinal y el tronco del encéfalo que coordinan grupos musculares individuales, y en forma indirecta por las neuronas motoras “superiores” en los centros superiores que regulan esos circuitos locales, que permiten y coordinan así secuencias complejas de movimientos. Son especialmente importantes los circuitos de los ganglios basales y el cerebelo, que regulan las neuronas motoras superiores; esto asegura que los movimientos se realicen con precisión espacial y temporal (Purves *et al.*, 2006).

Los sistemas motores pueden realizar muchas tareas motoras diferentes – reflejas, rítmicas y voluntarias - con velocidad y precisión debido a dos

características de su organización funcional. Primero, el procesamiento de las aferencias sensitivas y de las órdenes de las neuronas motoras y de los músculos ésta distribuido en áreas de la médula espinal, el tronco encefálico y el procencéfalo interconectadas jerárquicamente. Cada nivel posee circuitos que pueden, por sus conexiones de entrada y salida, organizar y regular respuestas motoras complejas. Segundo, la información sensitiva relacionada con el movimiento es procesada en diferentes sistemas que operan en paralelo.

La médula espinal es el nivel inferior de esta organización jerárquica. Contiene los circuitos neuronales que median diversos reflejos y automatismos rítmicos como la locomoción y el rascado. En el tronco encefálico están localizados circuitos similares que gobiernan los movimientos reflejos de la cara y la boca. El circuito nervioso más simple es monosináptico; comprende solo la neurona sensitiva primaria y la neurona motora. Sin embargo, la mayoría de los reflejos están mediados por circuitos polisinápticos, en los que entre una neurona sensitiva primaria y la neurona motora hay interpuestas una o más interneuronas. Las interneuronas y las neuronas motoras reciben también aferencias de axones que descienden de los centros superiores. Estas señales supramedulares pueden modificar las respuestas reflejas a los estímulos periféricos, facilitando o inhibiendo diferentes poblaciones de interneuronas. Sin embargo, todas las órdenes motoras terminan por converger sobre las neuronas motoras, cuyos axones abandonan la médula espinal o el tronco encefálico para inervar los músculos esqueléticos. Así, las neuronas motoras son la vía final común de toda acción motora.

El siguiente nivel de la jerarquía motora ésta en el tronco del encéfalo. Dos sistemas de neuronas del tronco encefálico, el medial y el lateral, reciben aferencias de la corteza cerebral y los núcleos subcorticales, y se proyectan hacia la médula espinal. Los sistemas descendentes mediales del tronco encefálico contribuyen al control de la postura, integrando información visual, vestibular y somatosensitiva. Los sistemas descendentes laterales controlan los músculos más distales y por lo tanto son importantes para los movimientos dirigidos a objetivos,

en particular del brazo y de la mano. Otros circuitos del tronco encefálico controlan los movimientos de los ojos y de la cabeza.

La corteza es el nivel más alto del control motor. La corteza motora primaria y varias áreas premotoras se proyectan directamente hacia la médula espinal a través del fascículo corticoespinal, y también regulan los haces motores que se originan en el tronco encefálico. Las áreas premotoras son importantes para coordinar y planificar secuencias complejas de movimiento. Reciben información de la corteza asociativa parietal posterior y la corteza prefrontal y se proyectan hacia la corteza motora primaria, así como a la médula espinal.

La variedad de circuitos de reflejos en la medula espinal y en el tronco encefálico simplifica las instrucciones que la corteza debe enviar a niveles inferiores. Facilitando algunos circuitos e inhibiendo otros, los niveles superiores pueden permitir que las aferencias sensitivas en los niveles inferiores gobiernen los detalles temporales de un movimiento en evolución. La cronología de la activación de los músculos agonistas y antagonistas es intrínseca al circuito medular y por lo tanto las propias señales descendentes no necesitan una sincronización tan precisa.

Además de los tres niveles jerárquicos – médula espinal, tronco encefálico y corteza - otras dos partes del encéfalo regulan también la planificación y la ejecución del movimiento. El cerebelo y los ganglios basales proporcionan circuitos de retroacción que regulan las áreas motoras corticales y del tronco encefálico: reciben aferencias de diferentes áreas de la corteza y se proyectan a áreas motoras de la corteza a través del tálamo. Los circuitos en bucle de estas dos estructuras fluyen a través de áreas separadas del tálamo y a diferentes áreas corticales. De forma similar, también las aferencias que reciben de la corteza son independientes. El cerebelo y los ganglios basales no envían aferencias importantes a la médula espinal, pero sí actúan de forma directa sobre las neuronas motoras del tronco encefálico (Kandel *et al.*, 2000).

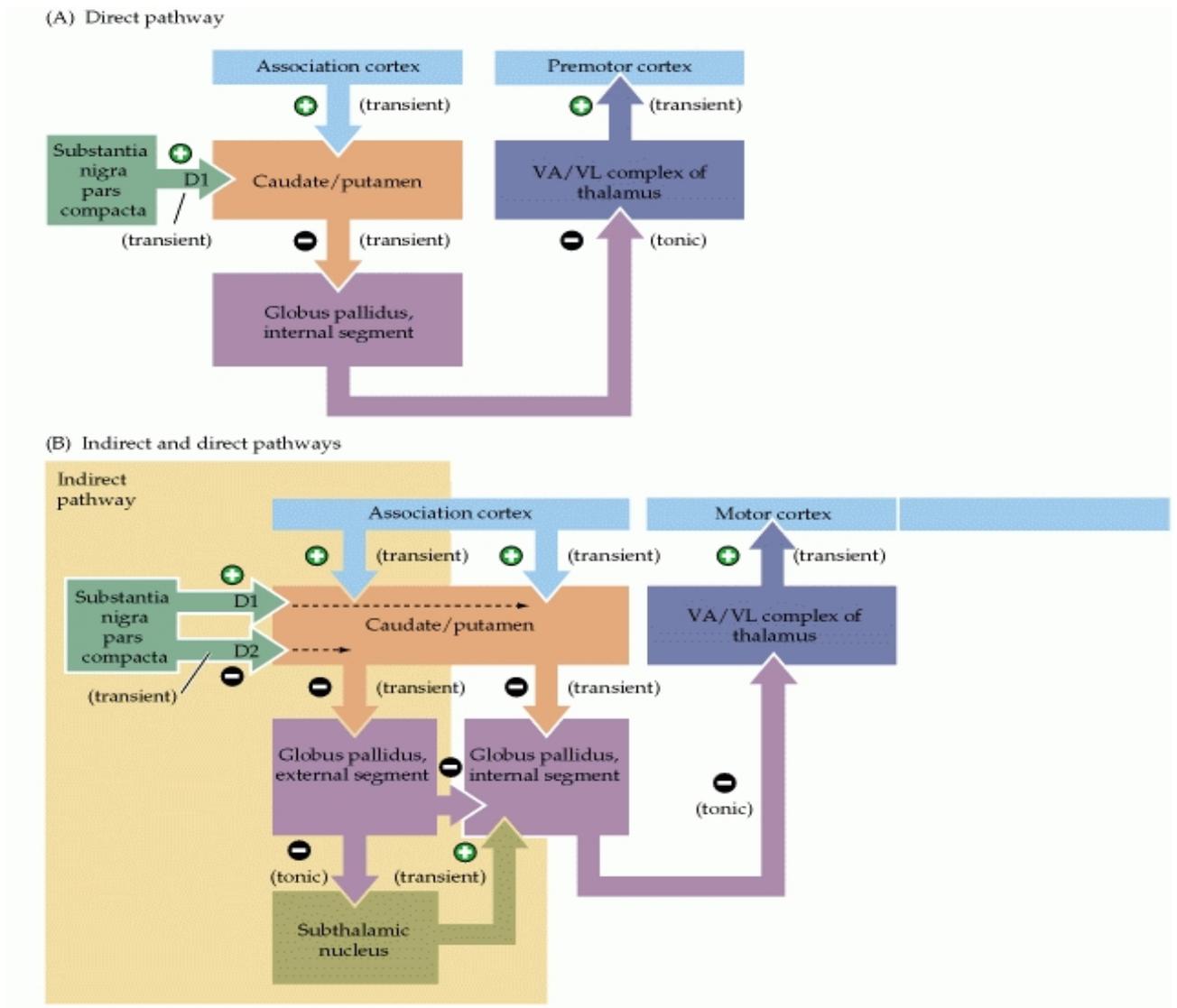


Fig. 17 Desinhibición en las vías directa e indirecta a través de los ganglios basales. A) en la vía indirecta, proyecciones transitoriamente inhibitorias del caudado y putamen proyectan a neuronas inhibitorias activas tónicamente en el segmento interno del globo pálido, el cual se proyecta a su vez al complejo VA/VL del tálamo. También son vistos impulsos excitatorios al caudado y putamen transitoriamente provenientes de la corteza y la sustancia negra, así como un impulso excitatorio del tálamo de regreso a la corteza. B) En la vía indirecta, neuronas inhibitorias transitoriamente activas del caudado y putamen se proyectan a neuronas inhibitorias transitoriamente activas del segmento externo del globo pálido. Nótese que la influencia del impulso dopaminérgico nigral sobre las neuronas en la vía indirecta es inhibitorio. Las neuronas del globo pálido (segmento externo) se proyectan hacia el núcleo subtalámico, el cual también recibe un fuerte impulso excitatorio proveniente de la corteza. El núcleo subtalámico, a su vez, proyecta neuronas hacia el globo pálido (segmento interno), donde su unidad excitatoria transitoria actúa oponiéndose a la acción desinhibitoria de la vía directa. De este modo, la vía indirecta modula el efecto de la vía directa (Tomada de *Neuroscience*, Sinauer Associates Inc., 2001).

Sistemas de Asociación

Las cortezas de asociación incluyen la mayor parte de la superficie cerebral del encéfalo humano y son responsables en gran medida del procesamiento complejo que tiene lugar entre la llegada de las aferencias a las cortezas sensitivas primarias y la generación del comportamiento. Las diversas funciones de las cortezas de asociación se denominan vagamente cognición, término que literalmente significa el proceso por el cual llegamos a conocer el mundo. Más específicamente, la cognición se refiere a la capacidad de prestar atención a los estímulos externos o a la motivación interna, de identificar el significado de esos estímulos y de planificar respuestas significativas. Las aferencias hacia las cortezas de asociación incluyen proyecciones desde las cortezas sensitivas primarias y secundarias, el tálamo y el tronco del encéfalo. Las eferencias desde las cortezas de asociación alcanzan el hipocampo, los ganglios basales y el cerebelo, el tálamo y otras cortezas de asociación (Purves *et al.*, 2006).

Cada corteza sensitiva primaria se proyecta a áreas de la corteza sensitiva próximas de orden superior, llamadas áreas de asociación unimodal, que integran la información aferente de una única modalidad sensorial. Las áreas de asociación unimodales se proyectan a su vez a las áreas de asociación sensorial multimodales que integran la información de más de una modalidad sensorial. Finalmente, las áreas de asociación sensorial multimodales se proyectan a las áreas de asociación motoras multimodales localizadas rostralmente a la corteza motora primaria en el lóbulo frontal. Las áreas motoras de orden superior transforman la información sensitiva en movimientos planificados y computan los programas para esos movimientos, que después son transmitidos a la corteza premotora y a la corteza motora primaria para su puesta en práctica.

Tres de las áreas de asociación multimodales resultan especialmente importantes. En primer lugar se encuentra el área de asociación posterior, situada en el límite de los lóbulos parietal, temporal y occipital, la cual vincula información de diversas modalidades sensitivas para la percepción y el lenguaje. El área de

asociación límbica, la cual se encuentra a lo largo del borde interno del hemisferio cerebral, se ocupa de las emociones y del almacenamiento de la memoria. Finalmente, el área de asociación anterior (corteza prefrontal) se localiza rostral a la circunvolución precentral, y se ocupa de la planificación de los movimientos.

Los estudios de las vías sensitivas aferentes y las áreas de asociación de la corteza se han traducido en tres principios importantes del procesamiento de la información sensitiva:

1. La información sensitiva se procesa en una serie de relevos a lo largo de varias vías paralelas, desde los receptores periféricos hasta la corteza de asociación unimodal y a la corteza de asociación multimodal de la parte posterior del hemisferio: las cortezas parietales y temporales posteriores.
2. La información sensitiva que representa diferentes modalidades converge en áreas de la corteza que integran esa información en un fenómeno polisensorial.
3. Las áreas de asociación posteriores que procesan información sensitiva están profusamente interconectadas con las áreas frontales de asociación responsables de la planificación de acciones motoras. Estas áreas de asociación anteriores convierten los planes sobre conductas futuras en respuestas motoras concretas (Kandel *et al.*, 2000).

ANEXO B

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

En 1872, George Huntington dio a conocer su trabajo *On Chorea*, publicado en *The Medical Reporter* de Filadelfia (Heathfield, 1973), en el cual dio a conocer las historias de algunos pacientes que había visto durante su infancia, cuando acompañaba a su padre a las visitas a domicilio de pacientes en Long Island (Wexler, 2006). Huntington observó la que él llamó *corea hereditaria* en East Hampton, Nueva York, donde creció siendo el hijo y nieto de médicos. Ya como médico calificado, se mudó a Pomeroy, Ohio, para comenzar su práctica médica.

Ha sido ampliamente reconocido que G. Huntington no fue el primero en describir esta enfermedad en adultos, pero tuvo el mérito de dar a conocer de manera sencilla y poco pretenciosa los aspectos característicos de la enfermedad. La primera descripción de la corea hereditaria en América fue dada por Waters en 1841. La descripción más temprana parece ser la dada por Elliotson en 1832. Elliotson atribuyó la carencia de reconocimiento de la enfermedad antes de 1830 al tiempo promedio de vida corto y a la población pequeña del Reino Unido. Artículos importantes hechos por Vessie (1932) en América y Critchley (1934) en Inglaterra resumen la historia de la enfermedad en esos países hasta principios de 1930. Vessie encontró que la mayoría de los casos presentados en nueva Inglaterra fueron descendientes de tres individuos de Bures en Suffolk, quienes emigraron de Colchester, Inglaterra en 1632, y fue capaz de trazar cerca de 1000 casos abarcando doce generaciones en 300 años a partir de estos tres casos. Otras descripciones históricas son las hechas por Barbeau *et al.* en 1964, quien trazó 173 casos de franco-canadienses originarios de Quebec a partir de una mujer que emigró a Montreal desde Francia en 1645, y de Brothers en 1949 quien encontró que 87 casos trazados en Tasmania tuvieron un ancestro común en una mujer de Huguenot stock quien emigró con su familia de trece hijos de Somerset en 1848.

En el siglo transcurrido desde la publicación de Huntington, la literatura de esta enfermedad ha crecido enormemente y los artículos aparecidos provienen de casi todas las partes del mundo, excepto la Unión Soviética y la China comunista (Heathfield, 1973).

La enfermedad de Huntington (EH) es caracterizada por una sorprendente especificidad de pérdida neuronal. Las regiones más sensibles al daño causado por la mutación en el gen que codifica para la proteína huntingtina (htt) son el cuerpo estriado, donde típicamente hay una pérdida de ~ 57% del área transversal del núcleo caudado y de ~ 65% del putamen. Dentro del estriado, las células más susceptibles son las neuronas espinosas mediales, las cuales muestran cambios dendríticos incluyendo el arqueado de las dendritas y alteración en la densidad, forma y tamaño de las espinas. Entre las neuronas espinosas, las neuronas que se proyectan al globo pálido externo y contienen encefalina son más susceptibles que las neuronas que se proyectan al globo pálido interno y contienen sustancia P (Rubinsztein, y Carmichael, 2003). Estas células están asociadas con el neurotransmisor inhibitorio ácido gama-aminobutírico (GABA). Otras evidencias sugieren que las neuronas piramidales en el giro angular del lóbulo parietal (que tiene proyecciones al núcleo caudado) también degeneran en la EH. Las neuronas no espinosas largas colinérgicas en el estriado no presentan un daño aparente (Walling et al., 1998).

Aunque la patología de la EH es más obvia en el cuerpo estriado, es probable que mucha de la degeneración ocurra en otros lugares como la corteza cerebral, en la cual la pérdida de volumen ocurre debido a la afectación de neuronas piramidales largas en las capas III, V y VI. Esta pérdida cortical puede ser uno de los cambios tempranos en el curso de la enfermedad, y es manifestada en casos avanzados. En casos avanzados también hay una pérdida de neuronas en el tálamo, la sustancia nigra pars reticulata y en el núcleo subtalámico. Adicionalmente, el volumen del globo pálido es reducido, lo cual es debido primariamente a la pérdida de conexiones de fibras estriatales.

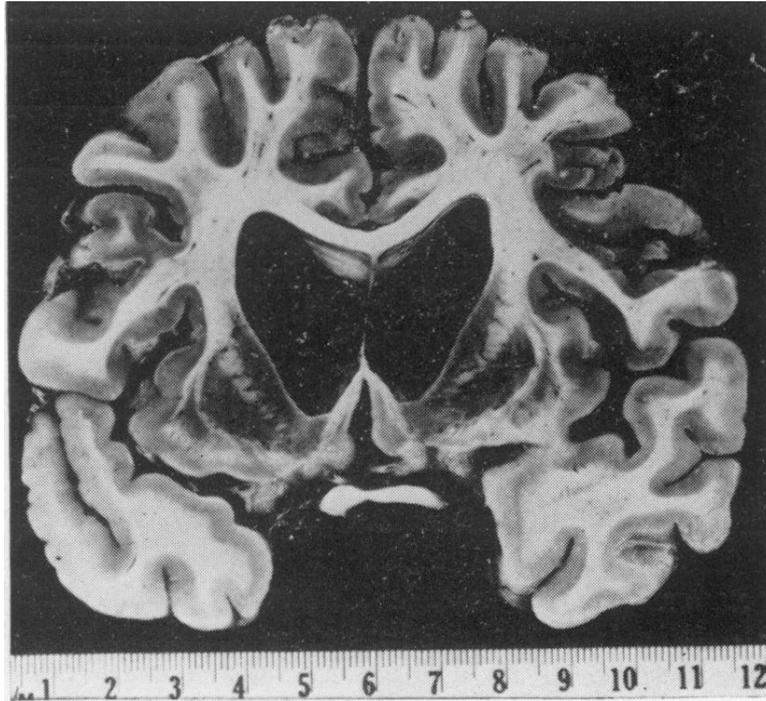


Fig. 18 Sección coronal de un cerebro en un estado avanzado de la Corea de Huntington mostrando atrofia de los ganglios basales y giro cortical, además de ventrículos laterales dilatados.

La atrofia cerebelar es reportada más frecuentemente en casos con un inicio temprano de la enfermedad. La astrigiosis fibrilar refleja la pérdida neuronal como progreso de la enfermedad (Rubinsztein y Carmichael, 2003). Todo lo anterior deriva en defectos cognitivos, anormalidades psiquiátricas y trastornos del movimiento (Shi-Hua *et al.*, 2004).

La patología característica de la EH es la degeneración neuronal selectiva, ya que provoca una atrofia más acusada en el cuerpo estriado. Dicha degeneración neuronal es producida por la expansión del trinucleótido CAG del gen de la huntingtina (*htt*) que contiene 3136 residuos y con un peso molecular de ~360kDa. Esta expansión es causada por una mutación en el brazo corto del cromosoma 4 (4p 16.3), siendo la *htt* la proteína afectada (Pérez de la Cruz, V. 2007). El exón 1 del gen sin mutar contiene un tramo ininterrumpido de repeticiones del trinucleótido CAG, el cual es traducido a una serie consecutiva de residuos de glutamina conocido como tracto de poliglutamina (polyQ). Individuos asintomáticos

tienen 35 o menos repeticiones de CAG; la EH es causada por la expansión de 36 o más repeticiones (Rubinsztein y Carmichael, 2003).

La función de la htt, tanto en pacientes con la EH como en individuos sanos, no está totalmente entendida. Una posible explicación para su función en la patogénesis de la EH es su interacción con ciertas proteínas, lo cual está bajo investigación actualmente (Shi-Hua *et al.*, 2004).

La hipótesis que tiende a explicar la muerte neuronal en la EH implica la disminución del metabolismo energético y alteraciones en la función mitocondrial, estrés oxidativo y neurotoxicidad con intervención de aminoácidos excitadores, como el glutamato, o por metabolitos endógenos del triptófano. Es posible que diversos mecanismos se complementen en la promoción de la lesión celular.

En la EH se produce un déficit del 55 % en la actividad de los complejos mitocondriales II y III y de un 25 % del complejo IV, en el caudado y el putamen. Los déficits del complejo II se caracterizan por la disminución de la oxidación de los sustratos dependientes del FADH₂, como el succinato, y en la oxidación normal de los dependientes del NADH, como el malato, mientras que el bloqueo del complejo III altera la oxidación de ambos. Pero cualquier déficit enzimático que afecta la cadena respiratoria, independientemente de su localización, atañe de manera importante al metabolismo celular, limitando el ciclo del ácido cítrico y la oxidación del piruvato, que pasa a ser metabolizado a lactato y así se reduce la producción de ATP.

Otras características que pueden llegar a presentarse son el aumento en la concentración de lactato, una disminución del N-acetil-aspartato (NAA), el cual es un marcador de integridad neuronal, y una disminución de la creatina y de la relación NAA/colina en el cuerpo estriado. La disminución de la creatina se correlaciona con la expansión del triplete CAG, el cual codifica para el aminoácido glutamina, y con los déficits motores y cognitivos. Las alteraciones del metabolismo energético pueden producirse en tejidos periféricos de los pacientes con la EH que presentan una disminución de la relación fosfocreatina/Pi y de la

actividad del complejo I mitocondrial en el músculo y las plaquetas. Las alteraciones metabólicas musculares se acompañan de alteraciones morfológicas en las fibras musculares, las cuales se presentan dentadas, anguladas y con aumento de las mitocondrias grandes con crestas anormales.

Otro rasgo de la EH es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son moléculas generadas principalmente en la mitocondria durante el transporte de electrones en la cadena de fosforilación oxidativa, que, antes de convertir el oxígeno en agua, origina los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-), además del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ligados a las enzimas de la cadena. Casualmente, los electrones escapan de la cadena de oxidación y generan radicales libres. La formación de radicales libres es responsable del consumo de cerca del 2% del oxígeno usado en la respiración. Las ERO pueden generar reacciones en cadena con moléculas de todas las estructuras celulares, ya sean proteínas, lípidos de membrana, ácidos nucleicos, y alteran su función. Estas alteraciones se denominan estrés oxidativo. Debido a su localización en la matriz mitocondrial, a la falta de histonas y a sus mecanismos de reparación limitados, el ADN mitocondrial es el blanco principal del ataque de las ERO. En la EH se produce un aumento de las deleciones del ADN mitocondrial en los lóbulos temporal y frontal de la corteza, así como un aumento de la concentración de 8-hidroxi-deoxiguanosina, un marcador de la lesión oxidativa del ADN, en el caudado y en la corteza prefrontal. Asimismo, se produce un aumento en la concentración de glutatión oxidado, una enzima antioxidante, en el caudado; otro aumento, precoz y significativo, se la en la concentración de hierro en el cuerpo estriado, lo que probablemente contribuye a la selectividad de la pérdida neuronal de la enfermedad. La actividad de otra enzima, la aconitasa, dependiente de hierro, se ve reducida en un 92% en el núcleo caudado, un 73% en el putamen y un 48% en la corteza, lo cual acarrea una disminución en el metabolismo energético y la actividad antioxidante neuronal.

Es posible que algún tipo de neurotransmisión pueda contribuir en la pérdida neuronal preponderante en el cuerpo estriado. En la EH, la pérdida de neuronas

del cuerpo estriado que presentan receptores D2 de la dopamina, hace posible la inhibición GABAérgica en la parte externa del globo pálido, provocando la desinhibición del tálamo y el exceso de excitación del tálamo sobre la corteza motora. El glutamato es el principal aminoácido neurotransmisor excitante del SNC y el cuerpo estriado recibe una densa estimulación glutamatérgica de la corteza. Las neuronas del estriado presentan receptores del glutamato en abundancia, principalmente los sensibles al N-metil-D-aspartato (NMDA), que alteran la permeabilidad de los iones Ca^{2+} , Na^+ y K^+ . Los agonistas de los receptores NMDA provocan degeneración del cuerpo estriado y constituyen un modelo experimental de la EH. El aumento de la liberación del glutamato en el estriado puede contribuir en el estrés oxidativo a través de la inhibición por competitividad de la absorción de cisteína; por otro lado la disminución en la producción neuronal de ATP, como sucede en la EH, determina el cierre de los canales y bombas iónicas dependientes de ATP, despolarizando la membrana y perjudicando la restauración del potencial de reposo.

El calcio puede participar en la muerte celular a través de mecanismos que implican la activación de la óxido nítrico sintetasa (NOS), la fosfolipasa A_2 (PLA_2), proteasas y proteincinasas. El aumento de la producción de óxido nítrico, que origina el potente radical peroxinitrito, contribuye en el aumento del estrés oxidativo y en la concentración de hierro libre. Igual que el Ca^{2+} , la isquemia aumenta la actividad de la PLA_2 , que resulta al aumentar la concentración de lípidos bioactivos como el factor de agregación plaquetaria (PAF) y prostaglandinas, que estimulan respectivamente la liberación de glutamato presináptico y en la glía, potenciando su excitotoxicidad. El PAF también produce contracción de las arterias cerebrales, disminuyendo la perfusión sanguínea, y a través de la activación de la proteína cinasa C estimula más la activación de la PLA_2 , constituyendo un ciclo vicioso que contribuye en la excitotoxicidad. El estrés oxidativo también contribuye en la excitotoxicidad del glutamato, ya que los radicales libres inhiben la captación del mismo por parte de las células de la glía, aumentando su concentración extracelular. Por lo tanto, la neurotoxicidad inducida por glutamato está íntimamente relacionada con el estrés oxidativo.

Ciertos metabolitos endógenos del triptófano en la vía de síntesis del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD), las quinureninas, como el ácido quinolínico, pueden provocar la muerte neuronal debido al aumento de la producción de H₂O₂ y la excitotoxicidad por estímulo de los receptores del glutamato (Fernandez-Leite, 2001).

Como ya se ha mencionado, la EH presenta una pérdida neuronal selectiva, la cual es acompañada de astrositosis fibrilar y gliosis. La activación microglial encontrada en los cerebros de pacientes con la EH ha sido aceptada, a manera de una respuesta celular activa, como evidencia de mecanismos inflamatorios envueltos en esta patología. Diferentes estudios sugieren que la activación y/o sobrerregulación de varios factores envueltos en vías inflamatorias – incluyendo microglia, caspasa-1, caspasa-3, iNOS y NF-κB – están jugando un rol clave en la patogénesis de la EH. Específicamente, caspasa-1 e iNOS están sobrerreguladas en el cerebro de pacientes con la EH, lo cual sugiere que señales pro-apoptóticas, probablemente mediadas por NF-κB, están tomando lugar en la enfermedad (González-Cortés y Santamaría, 2007).

Se ha propuesto que la expansión de poliglutamina en la htt puede causar la enfermedad por la disminución en la unión de HIP-1 (huntingtin interacting protein1) a la htt y por lo tanto liberar la HIP-1 para formar un complejo pro-apoptótico (Gervais *et al.*, 2002). La disponibilidad de HIP-1 libre se correlaciona con la longitud de poliglutamina dentro de la htt. Adicional a los roles de tráfico vesicular, la HIP-1 libre forma un heterodímero con HIPPI (HIP-1 protein interactor); este heterodímero puede entonces reclutar procaspasa-8 e iniciar apoptosis a través de componentes de la vía extrínseca de muerte celular. De cualquier forma, es poco probable que este proceso sea el principal o único mecanismo de la enfermedad. Existen otras proteínas que pueden interactuar con la htt, una de ellas es la gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), enzima clave en el metabolismo energético (Burke, 1996). Si la huntingtina mutada inhibe la GAPDH podría producir un trastorno del metabolismo energético. Otra proteína es la HIP-2, la cual desempeña una función de conjugación con la

ubiquitina y, por lo tanto juega un papel en el procesamiento de residuos de proteínas (Li, 1995). Otro mecanismo por el cual se ha reportado que la expansión del tracto de poliglutamina en la htt causa apoptosis neuronal es por la activación de JNKs en células HN33, que es una línea celular neuronal derivada del hipocampo (Liu *et al.*, 2000).

El obstáculo a la conjugación de la htt mutante con las proteínas antes descritas puede conllevar a la formación de agregados intraneuronales, los cuales son rasgos comunes de todas las enfermedades por poliglutamina (Rubinsztein, 2003). Estos agregados han sido tomados como una de las causas de la patología por poliglutamina debido a que aparecen antes de los signos de la enfermedad en ratones transgénicos expresando el exón 1 del gen de la EH con repeticiones expandidas. Adicionalmente, el número de inclusiones en la corteza de pacientes con la EH se correlaciona con la edad y el número de repeticiones de CAG al inicio de la enfermedad. La formación de agregados en células cultivadas también se correlaciona con susceptibilidad a muerte celular (Rubinsztein, 2003).

El mecanismo exacto de agregación no es claro. Perutz propuso que la proteína con el tracto de poliglutamina expandido tiene una estructura alterada que facilita su propia asociación. Alternativamente o adicionalmente, la expansión de poliglutamina puede, por los puentes de hidrogeno entre las aminas de cadena principal y el lado polar de la cadena, formar láminas- β fuertemente unidas las cuales pueden actuar como “cierres polares” conllevando a agregación proteínica y precipitación (Perutz, 1999). La proteína mutada puede llegar a ser resistente a la remoción por el sistema ubiquitina/proteosoma, la principal maquinaria proteolítica que identifica proteínas mal plegadas dentro de la célula. Estudios hechos inhibiendo la actividad del proteosoma potencian la acumulación de fragmentos (Lunkes *et al.*, 2002). Estos hallazgos dejan poca duda de que la proteólisis N-terminal cercana al tracto de poliglutamina ocurre en htt mutante y requiere la actividad del proteosoma.

Las alteraciones bioquímicas encontradas en el caudado de pacientes con la EH son consecuencia de la muerte celular selectiva de neuronas de los ganglios

basales (Pérez-De la Cruz et al., 2007); dicha muerte neuronal está relacionada a la agregación proteínica intraneuronal (Rubinsztein, 2003). Estos cambios incluyen la disminución de los niveles del ácido γ -aminobutírico (GABA) y la enzima que lo sintetiza, glutamato descarboxilasa (GAD), la acetilcolinesterasa (ACh) y la enzima que la sintetiza, acetil-colina tranferasa (CAT), y algunos péptidos localizados específicamente en las neuronas espinosas mediales (Shoulson, 1984).

Como enfermedad neurodegenerativa, la EH es caracterizada por demencia y degeneración de los ganglios basales (caudado-putamen) y corteza cerebral, lo cual causa movimientos coreiformes anormales (Pérez-De la Cruz et al., 2007). El padecimiento inicial más frecuente es incoordinación y sacudidas involuntarias ocasionales en diferentes segmentos del cuerpo. Estas anormalidades pueden estar ausentes en reposo y, en este estado, los individuos afectados pueden ser incapaces de realizar movimientos faciales complejos como soplar, silbar y fruncir el ceño. Esto puede ser una forma de apraxia bucofacial, la cual ocurre antes del inicio de la corea más evidente (Hayden, 1981). Una proporción pequeña de pacientes nunca desarrollan la típica corea, y pueden presentar una rigidez progresiva generalizada.

Si bien los síntomas neurológicos frecuentemente son descritos como manifestaciones iniciales de la EH, las alteraciones conductuales pueden preceder los desordenes del movimiento por una década o más. Los pacientes son excesivamente irritables, impulsivos, inestables o agresivos. La depresión es el síntoma psiquiátrico temprano más común, y la psicosis puede, adicionalmente, ser una de las primeras manifestaciones. Síntomas de naturaleza emocional o alteraciones en la personalidad preceden o coinciden con el inicio de los movimientos coreicos en el 50 % de los pacientes (Folstein *et al.*, 1979).

Como ya se ha mencionado, el rasgo más distintivo de la EH es la presencia de movimientos coreicos involuntarios, los cuales están presentes en el 90 % de los individuos afectados (Hayden, 1981). Los movimientos coreicos de la EH son menos abruptos y rápidos que los vistos en otras enfermedades con disfunciones motoras. A la vez que la enfermedad progresa, la naturaleza de estos movimientos

llega a ser gradualmente más atetótica, tomando un carácter distónico (Haddad, y Cummings, 1997).

Los pacientes con la EH tienen una marcha característica, la cual es interrumpida por movimientos coreicos. Eventualmente, los pacientes encuentran imposible caminar. La bradicinesia, asociada o no con rigidez, también puede estar presente, especialmente en estados avanzados de la enfermedad, cuando la extrema ralentización de los movimientos ocurre.

De esta manera, en la EH, además del deterioro en los movimientos involuntarios, también lo hay en los movimientos voluntarios en su conjunto (Haddad y Cummings, 1997). Las alteraciones psiquiátricas y cognitivas en la EH pueden aparecer antes, durante o después de las disfunciones motoras (Haddad y Cummings, 1997).

Dentro de las alteraciones cognitivas presentes en la EH, la demencia es una de las principales y se caracteriza inicialmente por el decline de las funciones del sistema frontal-subcortical, con una preservación relativa de la memoria hasta las últimas fases de la enfermedad (Morris, 1995). La memoria inmediata permanece sin cambios, pero la memoria reciente es afectada significativamente (Aminoff *et al.*, 1975), así como la memoria remota (Caine *et al.*, 1978). El recuerdo de información es muy afectado, mientras que el reconocimiento puede ser normal o solo ligeramente alterado (Brandt *et al.*, 1985). La memoria de procedimiento para las tareas motoras también se ve afectada (Cummings *et al.*, 1990).

Las funciones visuoespaciales también son deterioradas (Potegal, 1971), así como el lenguaje, aunque es poco común (Wallesch *et al.*, 1988). Los patrones de deterioro cognitivo (ralentización del pensamiento y anormalidades en la resolución de problemas, juicio, concentración y motivación, así como la presencia de síntomas psicopatológicos, en particular irritabilidad y apatía) y la similitud de los patrones observados en la Enfermedad de Parkinson, la parálisis supranuclear progresiva y la Enfermedad de Wilson conducen a la clasificación del deterioro cognitivo de la EH como “demencia subcortical” (Cummings *et al.*, 1990).

Las alteraciones de la personalidad son los síntomas psiquiátricos más comunes e incluyen irritabilidad, apatía, labilidad emocional, impulsividad y agresividad. Los trastornos del humor, en particular la depresión, es la segunda manifestación psiquiátrica más común (Cummings, 1995). La depresión es más común entre los pacientes con un inicio tardío de la enfermedad, y puede preceder a los síntomas psiquiátricos. Episodios maníacos también pueden ser encontrados en pacientes con la EH, aunque la manía es menos común que la depresión (Folstein *et al.*, 1979).